



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Estudo dos flebótomos (Diptera, Phlebotominae),  
vectores de *Leishmania* sp.  
no Concelho de Torres Novas, Portugal**

**Sofia Isabel Martins Branco**

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica realizada sob a orientação científica de:

Orientador – Professora Doutora Maria Odete Afonso

Co-orientador – Professora Doutora Lenea Campino

*Aos meus pais por terem esperado que encontrasse o meu rumo, ao Nuno por o ter consolidado, e ao Zoom, por ser o meu “Prozac” de quatro patas.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os que me auxiliaram na realização deste trabalho, e cujo contributo foi essencial, dentro e fora do âmbito académico:

À minha Orientadora, Professora Doutora Maria Odete Afonso, pela sua boa disposição e “paixão flebotomínica”, e pelo extraordinário empenho que dedicou à minha formação, ultrapassando em todos os aspectos o que se espera de um Orientador. Os seus ensinamentos, paciência e orientação contribuíram para o meu crescimento, não só a nível curricular, como pessoal e emocional. Um “gigantesco” obrigada por tudo!

À minha Co-Orientadora, Professora Doutora Lenea Campino, pelos ensinamentos na área das *Leishmanias* e Biologia Molecular e pelo entusiasmo e pragmatismo transmitidos.

Ao Doutor Carlos Alves Pires, pelo seu bom humor, e disponibilidade em encontrar os “artigos impossíveis”, quando já não sabia mais onde os procurar.

À Doutora Carla Maia, Doutora Sofia Cortes e Dr. José Manuel Cristovão da Unidade de Leishmanioses do IHMT, pelo auxílio na realização das técnicas laboratoriais moleculares.

À Professora Doutora Luzia Gonçalves pelos esclarecimentos prestados na área da análise Estatística.

Ao meu Avô António, ao meu Irmão Pedro e ao meu Tio Carlos, por toda a companhia e ajuda prestada nas capturas flebotomínicas, e aos meus Pais António e Tina pelo seu apoio incondicional.

Ao Nuno Vieira pelo apoio gráfico e tratamento das imagens.

Ao Coordenador da Unidade de Entomologia Médica do IHMT, Professor Doutor Paulo Almeida, e a todos os Colaboradores desta Unidade.

Aos habitantes do Concelho de Torres Novas que permitiram a colocação das armadilhas CDC, nas suas propriedades, sem os quais não teria sido possível realizar este trabalho.

## RESUMO

### **Estudo dos flebótomos (Diptera, Phlebotominae), vectores de *Leishmania* sp. no Concelho de Torres Novas, Portugal.**

**Sofia Isabel Martins Branco**

**PALAVRAS-CHAVE:** flebótomos, bioecologia, *Leishmania*, Torres Novas, Portugal.

Os flebótomos são insectos vectores de vários agentes patogénicos, dos quais se destacam os protozoários do Género *Leishmania*. Em Portugal, as leishmanioses, canina e humana, são causadas por *L. infantum*, sendo o cão o principal reservatório e *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* os vectores comprovados do parasita. São conhecidos três focos de doença, mas casos de leishmaniose canina têm sido reportados em outras regiões nas quais se desconhecem as espécies flebotomínicas presentes e respectivas taxas de infecção.

Neste trabalho, efectuou-se a primeira prospecção flebotomínica no Concelho de Torres Novas, Distrito de Santarém, localizado na região Centro de Portugal. Os principais objectivos foram determinar a fauna flebotomínica do Concelho, os aspectos bioecológicos, as taxas de infecção por *Leishmania* e os factores de risco para a transmissão vectorial.

De Junho a Novembro de 2010, 275 biótopos foram prospectados com armadilhas CDC. As capturas foram realizadas em 91 localidades, nas 17 freguesias do Concelho, e incluíram habitats domésticos, peridomésticos e silváticos. Os exemplares capturados foram identificados morfológicamente, as fêmeas utilizadas para detecção molecular de DNA de *Leishmania* e identificação das refeições sanguíneas. Análises de regressão simples e múltipla foram utilizadas para avaliação dos factores de risco para a presença das várias espécies flebotomínicas. Testes não paramétricos foram usados para comparar densidades.

Dos 1262 flebótomos capturados, quatro espécies foram assinaladas com as seguintes abundâncias relativas: *P. perniciosus* 73,69%, *P. ariasi* 8,16%, *P. sergenti* 6,58% e *Sergentomyia minuta* 11,57%. Em 82% das localidades prospectadas foi detectada pelo menos uma espécie flebotomínica e em 71,4% destas foi capturada pelo menos uma das espécies comprovadamente vectoras de *L. infantum*. *P. perniciosus* foi assinalado em todas as 17 freguesias do Concelho.

Os factores de risco identificados foram: temperaturas elevadas e humidades relativas baixas, locais abrigados e ausência de vento forte, presença de pinheiros como vegetação dominante, biótopos peridomésticos, particularmente currais de ovelhas e coelheiras, ou na proximidade de ovelhas, aves de capoeira e ninhos com andorinhas.

A taxa de infecção flebotomínica por *L. infantum* foi de 4% para *P. ariasi* e de 0,32% para o total de fêmeas capturadas.

A maioria das fêmeas para as quais se identificou a origem da refeição sanguínea pertencia a *P. perniciosus*. Esta espécie apresentou um comportamento oportunista, alimentando-se numa grande variedade de hospedeiros vertebrados.

A elevada abundância e distribuição das espécies vectoras, juntamente com a seroprevalência de *Leishmania* nos cães do Distrito (5-10%), e a captura de uma fêmea grávida de *P. ariasi* (infectante), sugerem que o Concelho de Torres Novas é um foco de leishmaniose no país.

A maior abundância relativa de *P. sergenti*, comparando com prospecções realizadas noutras áreas da região Centro de Portugal, sugere que este potencial vector esteja a expandir-se para latitudes mais elevadas, aumentando o risco de introdução de *L. tropica* no território, por contacto com imigrantes ou viajantes infectados de áreas endémicas.

A monitorização flebotomínica, e dos hospedeiros vertebrados, deverá ser continuada no Concelho para que medidas eficazes de controlo possam ser definidas e implementadas.

## ABSTRACT

### **Study of phlebotomine sand flies (Diptera, Phlebotominae), vectors of *Leishmania* sp. in Torres Novas Municipality, Portugal.**

**Sofia Isabel Martins Branco**

**KEYWORDS:** phlebotomine sand flies, bioecology, *Leishmania*, Torres Novas, Portugal.

Phlebotomine sand flies are hematophagous dipterans responsible for vectorial transmission of several pathogens, including protozoans of Genus *Leishmania*. In Portugal human and canine are caused by *L. infantum*, the dog the main reservoir, and *Phlebotomus perniciosus* and *P. ariasi* are the proven vectors of the parasite. Three foci are known but canine leishmaniasis has been reported from several other areas in the country, for which sand fly species and their infection rates are unknown.

This study is the first phlebotomine survey in Torres Novas Municipality, Santarém District, in Central Region, Portugal. The main objectives were to identify the phlebotomine species, their bioecological aspects, *Leishmania* infection rates, and vectorial transmission risk factors in the municipality.

From June to November, 2010, 275 biotopes were surveyed with CDC light traps. Captures were performed in 91 localities, covering the 17 parishes of the Municipality, and included domestic, peridomestic and silvatic biotopes. Captured specimens were identified morphologically and females were used for molecular detection of *Leishmania* DNA and blood meal identification. Simple and multiple regression analysis were used to determine risk factors for phlebotomine presence. Nonparametric tests were used to compare densities.

A total of 1262 sand flies were captured and identified. Four of the five species known for Portugal were detected, with the following relative abundances: *P. perniciosus* 73.69%, *P. ariasi* 8.16%, *P. sergenti* 6.58% and *Sergentomyia minuta* 11.57%. In 82% of localities at least one phlebotomine species was observed and in 71.4% at least one *L. infantum* confirmed vector species was present. *P. perniciosus* was captured in all the Municipality 17 parishes.

Risk factors were identified as: high average temperatures and low relative humidities, sheltered locations and absence of strong wind, presence of pine trees as dominant vegetation, peridomestic biotopes, particularly sheep pens and rabbit warrens, or in proximity of sheep, poultry and swallow nests.

*L. infantum* infection rate was 4% for *P. ariasi* and 0.32% for the total of phlebotomine females.

*P. perniciosus* exhibited an opportunistic behavior, feeding in a wide variety of vertebrate hosts.

The high abundance and distribution of confirmed vector species, combined with the dogs *Leishmania* seroprevalence in the District (5-10%), and the capture of a

gravid infective female, suggest that Torres Novas Municipality is a leishmaniasis focus in the country.

The higher abundance of *P. sergenti*, compared with surveys done in other areas of Central region of Portugal, suggests the vector may be expanding to higher latitudes, increasing the risk of introduction of *L. tropica* in the territory, by contact with infected immigrants or travelers from endemic areas.

Phlebotomine and vertebrate hosts monitoring should be implemented in the region and effective control measures developed.

## ÍNDICE

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract .....	vi
Lista de abreviaturas e siglas.....	xii

### 1 - Introdução

1.1 - Flebótomos (Diptera, Psychodidae).....	1
1.1.1 - Morfologia geral .....	2
1.1.1.1 - Morfologia dos imagos .....	2
1.1.1.2 - Morfologia das formas imaturas .....	6
1.1.2 - Taxonomia .....	7
1.1.3 - Distribuição .....	9
1.1.4 - Ciclo de vida e bioecologia geral.....	9
1.1.4.1 – Bioecologia dos imagos .....	11
1.1.4.2 - Bioecologia das formas imaturas .....	13
1.1.5 - Importância em Medicina humana e veterinária .....	14
1.2 - Leishmanioses.....	15
1.2.1 - Epidemiologia.....	16
1.2.2 - Manifestações clínicas da infecção por <i>Leishmania</i> sp. em humanos .....	19
1.2.3 - Manifestações clínicas da infecção por <i>L. infantum</i> em cães, raposas e gatos .....	20
1.2.4 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> e tipos de transmissão .....	21
1.2.4.1 - Desenvolvimento intravectorial de <i>Leishmania</i> sp. ....	23
1.3 - Flebótomos em Portugal .....	25
1.3.1 - Bioecologia das espécies flebotomínicas portuguesas .....	27
1.4 - Leishmanioses em Portugal .....	33
1.5 - Alterações climáticas, flebótomos e transmissão vectorial de <i>Leishmania</i> sp. ....	34
1.6 - Controlo das leishmanioses .....	36
1.6.1 - Controlo vectorial .....	37
1.7 - Monitorização flebotomínica em áreas endémicas .....	39
1.7.1- Métodos de captura de flebótomos .....	40
1.7.1.1 - Amostragem de formas imaturas .....	40
1.7.1.2 - Amostragem de imagos .....	40
1.7.2 - Métodos de detecção e identificação de <i>Leishmania</i> spp. em flebótomos .....	42



1.7.3 - Métodos de identificação das preferências hemáticas de flebótomos .....	43
1.8 - Objectivos .....	44
<b>2 - Material e Métodos</b>	
2.1 - Caracterização da área de estudo .....	46
2.1.1 - Demografia .....	47
2.1.2 - Orografia e Hidrologia .....	48
2.1.3 - Geologia .....	48
2.1.4 - Clima .....	48
2.1.4.1 - Temperatura .....	48
2.1.4.2 - Precipitação e Humidade relativa .....	49
2.1.4.3 - Ventos dominantes .....	49
2.1.4.4 - Classificação climática .....	49
2.1.5 - Coberto vegetal .....	51
2.1.6 - Fauna .....	51
2.2 - Captura de flebótomos .....	52
2.2.1 - Período de prospecção, método de captura e conservação do material .....	52
2.2.2 - Método de amostragem .....	53
2.2.3 - Biótopos prospectados .....	54
2.2.3.1 - Divisão e caracterização dos vários tipos de biótopos .....	54
2.2.3.2 - Registos dos biótopos .....	57
2.3 - Identificação morfológica dos flebótomos capturados .....	58
2.3.1 - Identificação dos flebótomos machos .....	58
2.3.2 - Identificação dos flebótomos fêmeas .....	59
2.3.3 - Chave dicotómica de identificação dos flebótomos .....	61
2.3.3.1 - Chave de Identificação para espécies flebotomínicas (Diptera, Psychodidae) do Género <i>Phlebotomus</i> e de <i>S. minuta</i> de Portugal, Espanha e Marrocos - Machos .....	63
2.3.3.2 - Chave de Identificação para espécies flebotomínicas (Diptera, Psychodidae) do Género <i>Phlebotomus</i> e de <i>S. minuta</i> de Portugal, Espanha e Marrocos - Fêmeas .....	67
2.4 - Fotografias .....	72
2.5 - Parâmetros determinados neste estudo .....	72
2.6 - Análise estatística .....	73
2.7 - Análise molecular .....	74
2.7.1 - Extração de DNA a partir de flebótomos .....	74
2.7.2 - Detecção de DNA de <i>Leishmania</i> sp. ....	76
2.7.2.1 - Amplificação do DNA cinetoplastideal com sequências iniciadoras MC ...	77

2.7.2.2 - Amplificação do DNA ribossomal com sequências iniciadoras ITS1 .....	78
2.7.2.3 - Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição de DNA-RFLP .....	79
2.7.3 - Análise das refeições sanguíneas .....	80
2.7.3.1 - Purificação dos Produtos de PCR .....	81
2.7.4 - Sequenciação e análise dos segmentos de DNA purificados .....	82

### 3 - Resultados

3.1 - Aspectos bioecológicos das espécies flebotomínicas capturadas .....	83
3.1.1 - Abundâncias relativas .....	83
3.1.2 - Razão dos sexos .....	84
3.1.3 - Fêmeas alimentadas e grávidas .....	85
3.1.4 - Rotação da genitália dos machos .....	87
3.1.5 - Ecto e endoparasitas (não <i>Leishmania</i> ) em flebótomos capturados .....	87
3.2 - Período de actividade, densidades flebotomínicas mensais e sua variação .....	88
3.2.1 - <i>Phlebotomus (Larroussius) perniciosus</i> Newstead, 1911 .....	89
3.2.2 - <i>Phlebotomus (Larroussius) ariasi</i> Tonnoir, 1921 .....	90
3.2.3 - <i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i> Parrot, 1917 .....	91
3.2.4 - <i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta</i> (Rondani, 1843) .....	92
3.3 - Temperaturas e humidades relativas mensais .....	93
3.4 - Distribuição geográfica .....	94
3.5 - Distribuição flebotomínica por tipo de biótopo .....	101
3.5.1 - Biótopos domésticos .....	102
3.5.2 - Biótopos peridomésticos .....	103
3.5.2.1 - Densidades de <i>P. perniciosus</i> e <i>P. ariasi</i> nos vários tipos de biótopos que incluem canis .....	104
3.5.3 - Biótopos silváticos .....	105
3.6 - Factores de risco para a presença de flebótomos - Regressão logística .....	106
3.6.1 - <i>Phlebotomus (Larroussius) perniciosus</i> Newstead, 1911 .....	106
3.6.2 - <i>Phlebotomus (Larroussius) ariasi</i> Tonnoir, 1921 .....	109
3.6.3 - <i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i> Parrot, 1917 .....	112
3.6.4 - <i>Sergentomyia (Sergentomyia) minuta</i> (Rondani, 1843) .....	115
3.6.5 - Factores de variação nas densidades, em relação aos biótopos positivos para flebótomos .....	118
3.7 - Associação de espécies .....	119
3.7.1 - Associação entre as várias espécies flebotomínicas .....	119
3.7.2 - Associação entre as diferentes espécies de vertebrados domésticos e as várias espécies flebotomínicas .....	119

3.8 - Análise molecular .....	120
3.8.1 - Taxa de infecção flebotômica por <i>Leishmania</i> sp. ....	120
3.8.2 - Identificação das refeições sanguíneas .....	123
<b>4 - Discussão e Conclusões.....</b>	<b>128</b>
Referências bibliográficas.....	144
Lista de figuras e quadros .....	172
Anexos .....	177

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentagem

°C - Grau Celsius

µm - Micrometro

CDC - “Centers for Diseases Control and Prevention”

Cit b - Citocromo b

cm - Centímetro

CMDFCI - Comissão Municipal de Defesa da Floresta Contra Incêndios

COI - Citocromo c Oxidase Subunidade I

Csa - Clima temperado mediterrânico, com verões quentes e chuvas no Inverno, segundo a classificação de Köppen

DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano

DNA - Ácido desoxiribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético , do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”

ELISA - do inglês “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

Ex.- Exemplo

HAART - Terapêutica anti-retroviral de elevada eficácia, do inglês “Highly active antiretroviral therapy”

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

I<sub>o</sub> - Índice ombrotérmico

IPCC - Painel intergovernamental em alterações climáticas, do inglês “Intergovernmental Panel on Climate Change”

I<sub>tc</sub> - Índice de termicidade compensado

ITS - Espaçadores internos transcritos, do inglês “Internal transcribed spacers”

kDNA - DNA cinetoplastideal

Km - Kilómetro

m - Metro

M - Mol

MLEE - Mobilidade electroforética de isoenzimas, do inglês “Multi-Locus Enzyme Electrophoresis”

mA - Miliampere

mm - Milímetro

mM - Milimole

NNN - Novy-MacNeal-Nicolle

N - Norte

O - Oeste

OMS - Organização Mundial de Saúde

pb - pares de base

PCR - reacção em cadeia da polimerase, do inglês “Polymerase chain reaction”

pM - picomol

PNOC - Prepronociceptina

RFLP - Hidrólise do DNA amplificado por endonucleases de restrição, do inglês “Restriction fragment lenght polymorphism”

RNA - Ácido ribonucleico, do inglês “Ribonucleic acid”

rRNA - Ácido ribonucleico ribossómico, do inglês “Ribosomal ribonucleic acid”

SIA - Análise de isótopos estáveis, do inglês “Stable isotopes analysis”

SIDA - Síndrome de imunodeficiência adquirida

TAE - Tris-Acetato-EDTA

UNL - Universidade Nova de Lisboa

UPMM - Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas

V- Volt

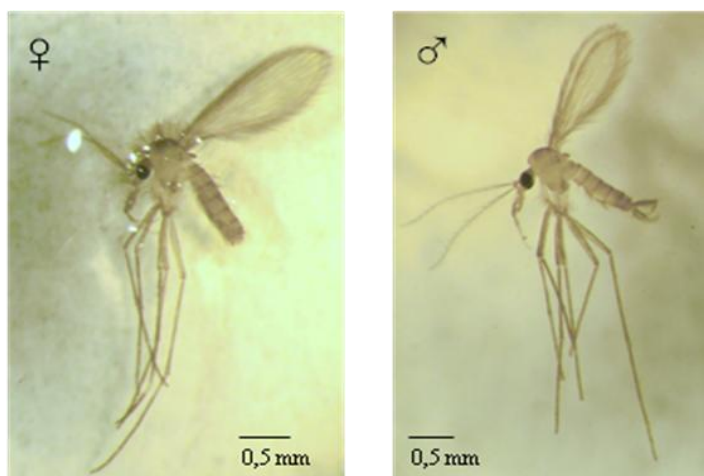
VIH - Vírus da imunodeficiência humana

Vs - em oposição a, do latim “*versus*”

# 1- Introdução

## 1.1 - Flebótomos (Diptera, Psychodidae)

Os flebótomos (em inglês “phlebotomine sand flies”), em Portugal muitas vezes confundidos erradamente com mosquitos (Família Culicidae), são dípteros nematóceros de pequenas dimensões (2 a 5 mm de comprimento), de antenas longas, aspecto frágil, coloração que varia de castanha clara a negra, e de corpo alongado revestido de finas sedas (Fig. 1) (Killick-Kendrick, 1999).



**Figura 1** - Flebótomos adultos, fêmea e macho, conservados em álcool (fotografias de Sofia Branco, exemplares capturados em Torres Novas, 2010).

Pertencem à Família Psychodidae e à Subfamília Phlebotominae. Esta Subfamília distingue-se das restantes Subfamílias de psicodídeos (Trichomyiinae, Sycoracinae, Psychodinae, Bruchomyiinae e Horaiellinae) pela presença de (Lawyer *et al.*, 2011):

- 1- Olhos separados, sem a presença de ponte interocular.
- 2- Palpos articulados com cinco segmentos.
- 3- Aparelho bucal picador-sugador e em que as peças bucais são pelo menos tão longas como a cabeça.
- 4- Segmentos antenares aproximadamente cilíndricos.

5- Nervura radial da asa com cinco ramos.

### **1.1.1 - Morfologia geral**

A caracterização morfológica dos flebótomos, apresentada neste trabalho, foi efectuada com base nos trabalhos de Rioux *et al.* (1969), Abbonenc (1972) e Pires (2000).

#### **1.1.1.1 - Morfologia dos imagos**

Os flebótomos adultos apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e abdómen.

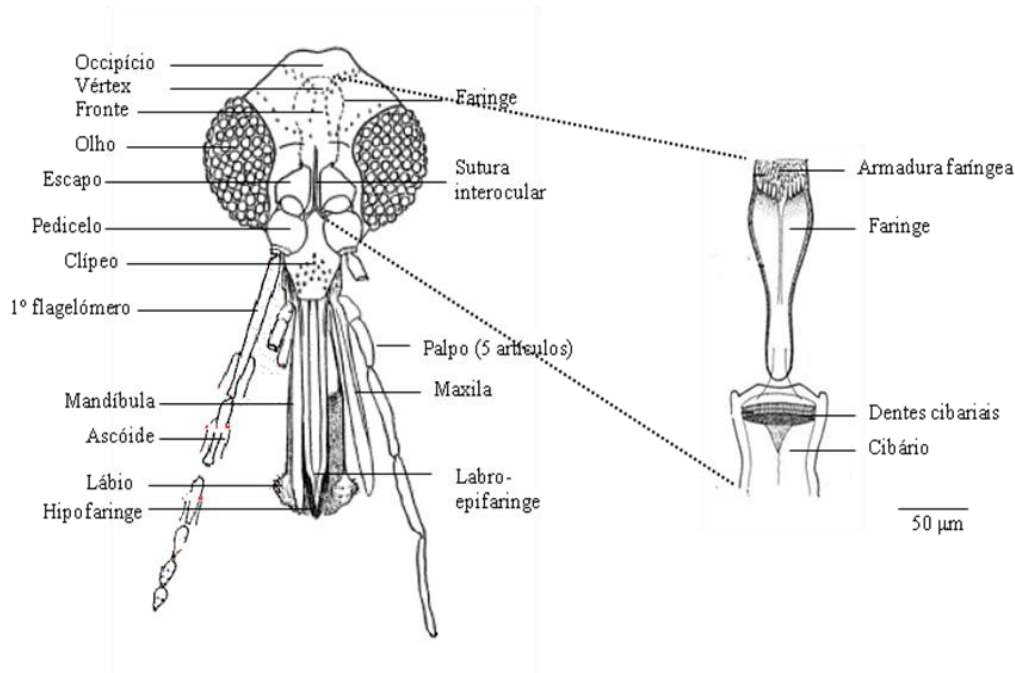
##### Cabeça

A cabeça (Fig. 2) apresenta um par de olhos compostos separados, na face dorsal, pela fronte, pela área de inserção das antenas, pela sutura interocular e pelo clipeo.

O aparelho bucal é do tipo picador-sugador, formado por seis peças: lábio, epifaringe, um par de mandíbulas e um par de maxilas. Estas, estão ausentes nos machos. Os palpos articulados, com cinco segmentos, inserem-se ao nível das maxilas.

O aparelho bucal prolonga-se, no interior da cavidade cefálica, num canal que se divide em duas regiões sucessivas: o cibário, ou cavidade bucal, e a faringe. Estas estruturas podem apresentar espículas, escamas, ou dentes, com importância taxonómica.

Ambos os sexos apresentam um par de antenas longas com 16 segmentos, o primeiro segmento (escapo) é cilíndrico, o segundo (pedicelo) aproximadamente esférico, e o flagelo é constituído por 14 segmentos (flagelómeros) longos e delgados. Os flagelómeros apresentam um par de ascóides ou espinhas geniculadas. Nas antenas, a dimensão relativa dos flagelómeros e dos ascóides, bem como o ponto de inserção e morfologia destes últimos, são utilizados na identificação das espécies.



**Figura 2** - Vista dorsal da cabeça de um flebótomo e pormenor da faringe e cibário (adaptado de El-Hossary, 2006 e Theodor, 1958).

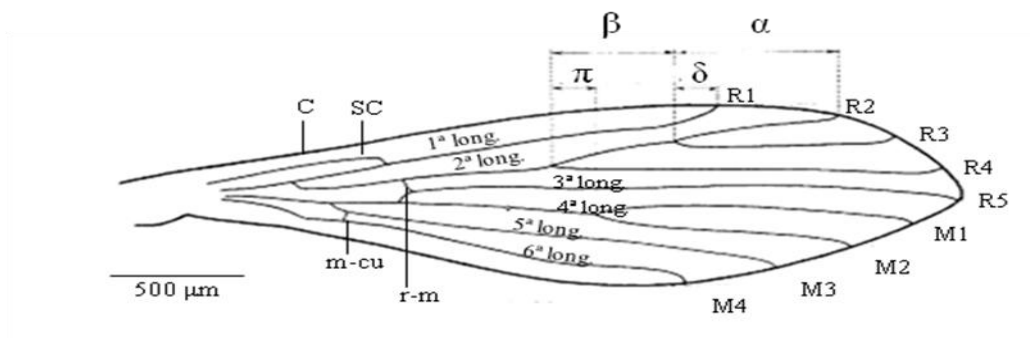
### Tórax

O tórax, com aspecto giboso, apresenta as asas (um par na região dorsal do mesotórax), os balanceiros (um par na região dorsal do metatórax) e as patas (três pares na região ventral, um par por cada segmento torácico):

- As asas são lanceoladas, pilosas e verificam-se nove nervuras bem individualizadas (Fig. 3): sete nervuras longitudinais e duas transversais. Nas nervuras longitudinais, a segunda, ou radial, bifurca-se originando um ramo anterior R1, ou primeira longitudinal, e um ramo posterior, ou segunda longitudinal. Esta última, bifurca-se duas vezes dando origem à nervura R4, na primeira ramificação, e às nervuras R2 e R3 na segunda. A quarta nervura longitudinal apresenta uma única ramificação, e as restantes nervuras são simples (sem ramificações). Os parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\pi$ , bem como o índice alar ( $\alpha/\beta$ ) apresentam importância taxonômica. As nervuras transversais encontram-se perto da base da asa.

Quando o flebótomo se encontra em repouso as asas apresentam uma posição característica, em forma de V num ângulo de 45° em relação ao corpo.





**Figura 3** - Asa de flebótomo e respectiva nomenclatura das nervuras e parâmetros alares:

C - nervura costal, SC - nervura subcostal, 1ª a 6ª long. - 1ª a 6ª nervuras longitudinais, r-m - nervura transversa que liga a 3ª e a 4ª longitudinais, m-cu - nervura transversa que liga a 4ª, 5ª e 6ª longitudinais. A radial bifurca-se na base originando um ramo anterior R1 e um ramo posterior ou 2ª longitudinal, que por sua vez se bifurca duas vezes, originando os ramos R2-R3 e o ramo R4. Os ramos M1 e M2 resultam da bifurcação da 4ª nervura longitudinal. A nervura cubital ou 7ª longitudinal é curta e geralmente pouco visível (adaptado de Rioux *et al.*, 1969).

- As patas são longas, com 5 a 6 mm de comprimento, cobertas por escamas e sedas, e são compostas, como em todos os dípteros, por coxa, trocanter, fêmur, tíbia e tarso, este último com 5 segmentos.

### Abdómen

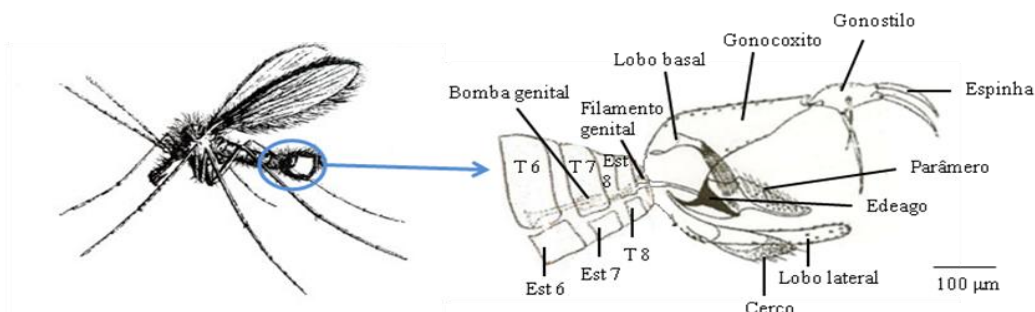
O abdómen é aproximadamente cilíndrico e composto por dez segmentos subiguais cobertos de sedas. A disposição das sedas nos tergitos apresenta importância taxonômica para a identificação dos Gêneros.

Os segmentos posteriores do abdómen encontram-se modificados, constituindo a genitália (os três últimos segmentos na fêmea e os quatro últimos segmentos no macho). A morfologia desta estrutura é essencial para a identificação taxonômica de ambos os sexos.

O dimorfismo sexual é acentuado. Assim, o macho apresenta uma genitália com apêndices externos e formando um par de forcípulos dorsais, com aspecto de “garra”, (Fig. 4) e a fêmea apresenta um abdómen em forma de “cone”, com dois segmentos arredondados, os cercos, na sua extremidade posterior. No caso da fêmea, as estruturas sexuais são maioritariamente internas (Fig.5).

No macho, apenas os segmentos abdominais I a VIII são visíveis, os segmentos IX e X estão totalmente transformados em apêndices genitais. A genitália (ou terminália) é composta pelas seguintes estruturas:

- Um par de gonocoxitos ou artículos basais, volumosos, que dependendo das espécies podem apresentar, ou não, um lobo basal; um par de gonostilos ou artículos apicais, ligados aos gonocoxitos, onde se inserem espinhas fortemente quitizadas, em número variável.
- Um par de edeagos ou pênis, estruturas copuladoras externas que se prolongam para o interior do abdômen pelo filamento e bomba genital. As restantes estruturas internas do aparelho genital masculino consistem num par de testículos, um par de canais deferentes, uma vesícula seminal e um canal ejaculador, ligado à bomba genital.
- Um par de parâmeros.
- Um par de lobos laterais.
- Um par de cercos.

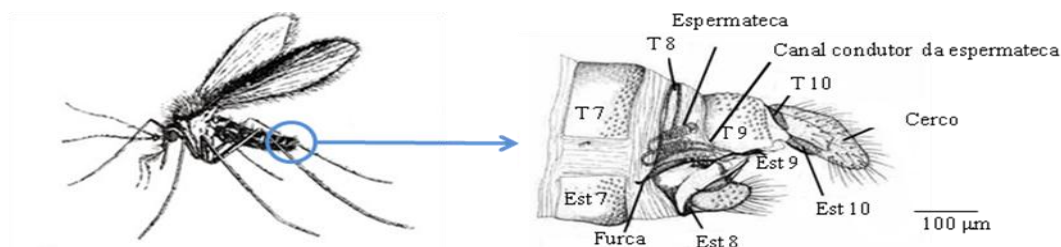


**Figura 4** - Pormenor da extremidade posterior do abdômen de um flebótomo macho e respectivas estruturas genitais externas e internas. T6 a T8 – tergitos 6 a 8; Est 6 a Est 8 – esternitos 6 a 8 (adaptado de Sabin *et al.*, 1944 e de Lawyer *et al.*, 2011).

Durante as primeiras 24 horas, após a eclosão do macho, a genitália sofre uma rotação de 180° até à posição definitiva, levando a que os gonostilos e gonocoxitos se localizem dorsalmente e as restantes estruturas se posicionem na face ventral.

Nas fêmeas, todos os segmentos abdominais são visíveis e o último (X) apresenta um par de cercos ou gonapófises ventrais, entre os quais se situa o orifício anal. As estruturas genitais são internas e incluem:

- O átrio genital com espículas, rodeado pela furca quitinizada, e que se inicia a partir do orifício genital.
- Um par de espermatecas, onde se mantém o esperma do macho após a cópula. Cada espermateca é constituída por um reservatório, ou cápsula, que por sua vez é constituído por uma cabeça, um corpo e um pescoço ou colo, que se liga através de um canal condutor ao átrio genital. Os canais condutores podem ser individuais em toda a sua extensão ou fundir-se num canal comum, consoante as espécies.
- Um par de ovários, constituídos pelos ovários cujo volume varia de acordo com o estado de desenvolvimento dos ovos. O oviducto é comum, formado pela junção dos canais condutores oriundos de cada um dos ovários.
- Um par de glândulas anexas, de forma alongada.



**Figura 5** - Pormenor da extremidade posterior do abdômen de um flebótomo fêmea e respectivas estruturas genitais internas. T7 a T10 – tergitos 7 a 10; Est 7 a Est 9 – esternitos 7 a 9

(adaptado de Sabin *et al.*, 1944 e Lane, 1993).

#### 1.1.1.2 - Morfologia das formas imaturas

O ovo tem uma forma elipsoidal, ligeiramente encurvada, e varia de 0,3 a 0,5 mm de comprimento. É revestido por uma membrana coriácea ou córion, de ornamentação variável e cuja coloração, inicialmente branca, logo após a postura, escurece gradualmente até se tornar castanha escura e depois negra.

As **larvas** são vermiformes e atingem cerca de 8 mm de comprimento. Apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e abdómen. A cabeça é bem desenvolvida e quitinizada. O abdómen é composto por nove segmentos, nos primeiros sete existem pseudópodes, ou falsas patas, e no último segmento (IX) insere-se um par de sedas caudais no primeiro estágio de desenvolvimento e dois pares nos restantes três estádios (na maioria das espécies flebotomínicas).

Na **pupa**, a cabeça e o tórax estão fundidos. Assim, o corpo está dividido em cefalotórax e abdómen, apresentando uma forma ligeiramente globosa. Os últimos segmentos abdominais encontram-se cobertos pela exúvia larvar do último estágio.

### 1.1.2 - Taxonomia

Em relação à Posição Taxonómica, os flebótomos pertencem ao Filo Arthropoda, Subfilo Hexapoda, Classe Insecta, Subclasse Pterygota, Superordem Endopterygota, Ordem Diptera, Subordem Nematocera, Infraordem Psychodomorpha, Família Psychodidae e Subfamília Phlebotominae (Leger & Depaquit, 2001).

É principalmente a nível dos Géneros que a classificação dos flebotomíneos é ainda motivo de controvérsia e não existe, até ao momento, um sistema universalmente aceite (Marcondes, 2007). Em 1977, Lewis e colaboradores propuseram a divisão em cinco Géneros, *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*, a que Leng, em 1987 acrescentou o Género *Chinius*. Esta classificação em seis géneros foi aceite durante vários anos e só recentemente, com os trabalhos de Rispail & Léger (1998) e Léger & Depaquit (2001), para as espécies do Velho Mundo, e de Galati (1995, 2003), para as espécies do Novo Mundo, a classificação da Subfamília Phlebotominae foi revista e definidos 34 Géneros: 10 no Velho Mundo, 22 no Novo Mundo e 2 Géneros extintos (Quadro 1).

**Quadro 1** - Gêneros da Subfamília Phlebotominae e sua distribuição geográfica  
(adaptado de Léger & Depaquit, 2001, Marcondes, 2007 e CIPA, 2011).

Gêneros de Phlebotominae	Distribuição geográfica
<i>Australophlebotomus</i> Theodor, 1948	Oceânia
<i>Bichromomyia</i> Artemiev, 1991	América do Norte, Central e do Sul
<i>Brumptomyia</i> França & Parrot, 1921	América Central e do Sul
<i>Chinius</i> Leng, 1987	China, Eurásia e África do Norte
<i>Dampfomyia</i> Addis, 1945	América do Norte, Central e do Sul
<i>Deanemyia</i> Galati, 1995	América do Sul
<i>Demeillonius</i> Davidson, 1980	Indo-Malásia, África a Sul do Sahara
<i>Evandromyia</i> Mangabeira, 1941	América do Sul
<i>Expapillata</i> Galati, 1995	América do Sul
<i>Grassomyia</i> Theodor & Mesghali, 1964	África, sul do Sahara
<i>Hertigia</i> Fairchild, 1949	América Central
<i>Idiophlebotomus</i> Quate & Fairchild, 1961	Oceânia, Indo-Malásia, Eurásia e África do Norte
<i>Lutzomyia</i> França, 1924	América do Norte, Central e do Sul
<i>Martinsmyia</i> Galati, 1995	América do Sul
<i>Micropygomyia</i> Barretto, 1962	América do Norte, Central e do Sul
<i>Migonemyia</i> Galati, 1995	América do Sul
<i>Nyssomyia</i> Barretto, 1962	América do Norte, Central e do Sul
<i>Oligodontomyia</i> Galati, 1995	América do Sul
<i>Parvidens</i> , Theodor & Mesghali 1964	África, Sul do Sahara
+ <i>Phlebotomiella</i> Meunier, 1905	+ extinta
+ <i>Phlebotomites</i> Hennig, 1972	+ extinta
<i>Phlebotomus</i> Rondani & Berté, 1840	Indo-Malásia, África (Norte e Sul do Sahara) e Eurásia
<i>Pintomyia</i> Costa Lima, 1932	América Central e do Sul
<i>Pressatia</i> Mangabeira, 1942	América Central e do Sul
<i>Psathyromyia</i> Barretto, 1962	América do Norte, Central e do Sul
<i>Psychodopygus</i> Mangabeira, 1941	América do Norte, Central e do Sul
<i>Sciopemyia</i> Barretto, 1962	América Central e do Sul
<i>Sergentomyia</i> França & Parrot, 1920	Oceânia, Indo- Malásia, África (Norte e Sul do Sahara) e Eurásia
<i>Spelaeomyia</i> Theodor, 1948	África, Sul do Sahara.
<i>Spelaeophlebotomus</i> Theodor, 1978	África, Sul do Sahara
<i>Trichophoromyia</i> Barretto, 1962	América Central e do Sul
<i>Trichopygomyia</i> Barretto, 1962	América Central e do Sul
<i>Viannamyia</i> Mangabeira, 1941	América Central e do Sul
<i>Warileya</i> Hertig, 1948	América Central e do Sul

Com a continuação do desenvolvimento de métodos moleculares e biométricos, aplicados ao estudo das relações filogenéticas entre flebotomíneos, a posição taxonómica dos diferentes Géneros poderá sofrer alterações mesmo em relação às actuais classificações (Munstermann, 2004).

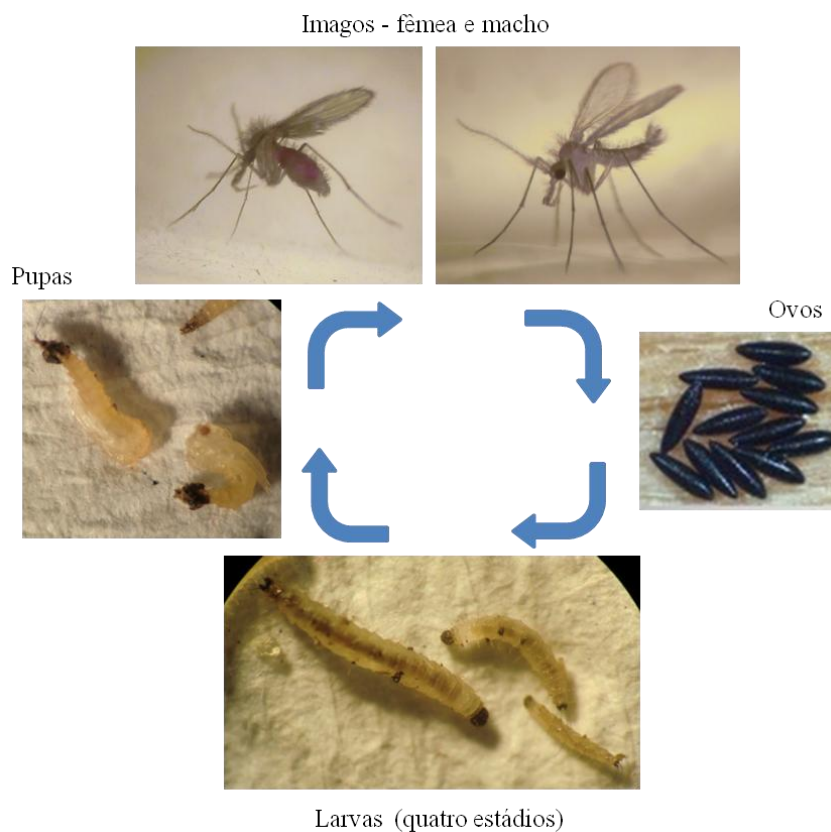
### **1.1.3 - Distribuição**

Desde a primeira descrição de um flebótomo, em 1691, por Philippon Bonanni, que ilustrou um pequeno insecto a que chamou "*Culex minimus*" (literalmente, pequeno mosquito) (Dedet, 2005), cerca de 850 espécies foram descritas (Brazil *et al.*, 2010). Estas encontram-se distribuídas por regiões temperadas, tropicais e subtropicais, nomeadamente na Europa, Ásia, África, América Central e do Sul e Austrália. O limite Norte da distribuição na Europa é 50° 10' N na Alemanha (Naucke *et al.*, 2008). Este limite é semelhante ao observado no Canadá, na América do Norte. A Sul atingem os 40° de latitude, não tendo sido reportada, até á presente data, a sua presença na Nova Zelândia e Ilhas do Pacífico. Podem ser encontrados flebótomos desde abaixo do nível do mar, em redor do Mar Morto, até uma altitude de 3300 m no Afeganistão (Killick-Kendrick, 1999).

Apesar de ampla, a distribuição não é contínua, estando condicionada localmente ao tipo de vegetação, clima e outros factores bióticos e abióticos (Afonso & Alves-Pires, 2008).

### **1.1.4 - Ciclo de vida e bioecologia geral**

Os flebótomos são insectos holometabólicos (metamorfoses completas), com quatro fases distintas de desenvolvimento: ovo, larva (com quatro estádios), pupa e imago ou adulto (Fig. 6).



**Figura 6** - Ciclo de vida dos flebotomos: fase aérea e terrestre

(fotografias de Sofia Branco, 2011, exemplares da colónia de *Phlebotomus perniciosus*, UEI PM, IHMT, UNL).

O ciclo de vida desenvolve-se em dois meios distintos: os adultos vivem em meio aéreo e as formas imaturas em meio terrestre. A duração de cada uma das fases é variável, dependendo da espécie, disponibilidade de alimento, condições climáticas e fotoperíodo (Munstermann, 2004) (Quadro 2).

**Quadro 2** - Duração aproximada das várias fases do ciclo de vida dos flebotomos  
(adaptado de Killick-Kendrick, 1999 e de Leger & Depaquit, 2001).

Fase do ciclo de vida	Duração aproximada
Após postura, eclosão da larva	7 a 14 dias
De larva a pupa	21 dias
De pupa a imago	5-10 dias
Desde o ovo a adulto	35- 60 dias (na ausência de diapausa larvar)
Longevidade dos imagos	15 a 60 dias

#### 1.1.4.1 - Bioecologia dos imagos

Tanto os machos como as fêmeas alimentam-se de sucos e açúcares vegetais (Lewis & Domoney, 1966) e de secreções de outros insectos como afídeos e coccídeos (Lucientes *et al.*, 2005), mas, no caso das fêmeas, estas são também hematófagas, tendo necessidade de efectuar uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado para que se dê a maturação ovárica. Algumas espécies são autogénicas, ou seja tem a capacidade de efectuar a primeira postura antes de realizar uma refeição sanguínea (Johnson, 1961; El-Kammah, 1973; Kassem & Hassan, 2003), e a partenogénese, apesar de rara, foi já reportada para duas espécies do Novo Mundo (Brazil & Oliveira, 1999; Alves *et al.*, 2008).

##### Período de actividade

Na sua maioria, os flebótomos apresentam actividade crepuscular e nocturna, quando a temperatura é mais baixa e a humidade relativa mais elevada. Existem algumas espécies que exibem actividade diurna quando o seu habitat é perturbado. O período de actividade, tanto o anual como o diário, é muito variado e fortemente condicionado por factores climáticos. Pensa-se que a velocidade do vento acima dos 1,5 metros por segundo iniba o vôo e que este seja totalmente suspenso se a velocidade atingir 4-5 m por segundo (Lane, 1993).

Nos países tropicais, observa-se actividade flebotomínica ao longo de todo o ano, podendo existir várias gerações anuais (até sete). Nas regiões temperadas, ocorre diapausa no quarto estágio larvar (Dolmatova & Demina, 1971) e verificam-se uma a duas gerações anuais (por vezes três). Em duas espécies neotropicais observa-se, excepcionalmente, diapausa no estágio de ovo (Lawyer & Young, 1991; Comer *et al.*, 1994).

##### Locais de repouso

Para repouso os flebótomos procuram geralmente locais frescos e húmidos como casas, latrinas, caves, estábulos, grutas, buracos nas paredes e muros, rochas, árvores ou



solo, zonas de vegetação densa, tocas de roedores e outros mamíferos, ninhos de aves e termiteiras (Killick-Kendrick, 1999).

### Dispersão

Os flebótomos são fracos voadores e afastam-se, no máximo, um ou dois Km dos seus criadouros (Killick-Kendrick *et al.*, 1984). Contudo, estas distâncias são variáveis conforme as espécies (Afonso & Alves-Pires, 2008).

### Comportamento alimentar das fêmeas

Embora as várias espécies flebotomínicas possam apresentar diferenças na preferência por um ou outro animal como fonte sanguínea, como por exemplo o ser humano ou o cão, a variação de potenciais hospedeiros é geralmente extensa, e dentro destes, na ausência de uma hospedeiro preferencial poderão apresentar um comportamento oportunista, alimentando-se no vertebrado disponível (Quinnel *et al.*, 1992; Maroli *et al.*, 2009).

Aproximam-se do “alvo” em pequenos vôos silenciosos e, ao picarem, dilaceram a pele do hospedeiro com pequenos movimentos de vaivém, formando um microhematoma de onde sugam o sangue (telmofágicas, “pool feeding”), ao mesmo tempo que inoculam saliva com propriedades anticoagulantes e vasodilatadoras. A picada é geralmente dolorosa, a refeição sanguínea tem uma duração entre 30 segundos a cinco minutos e a maioria das espécies são exofágicas e exofílicas (Leger & Depaquit, 2001).

### Reprodução

O acasalamento pode ocorrer antes ou depois da refeição sanguínea (Lucientes *et al.*, 2005) e, em alguns casos, os machos podem formar um “enxame” sobre o hospedeiro vertebrado, ou na sua proximidade, atraindo as fêmeas para a reprodução (Lane *et al.*, 1990; Jones, 2001). Actualmente, estudos indicam que na maioria das espécies esta atracção é causada pelo odor dos hospedeiros (Lainson & Rangel, 2005)

em combinação com feromonas (Morton & Ward, 1989; Chelbi *et al.*, 2011) e vibrações sonoras produzidas pelos machos (Ward *et al.*, 1988). Durante a cópula, o macho mantém a fêmea fixa por meio dos apêndices genitais e com os seus edeagos ou pênis, inserem o esperma no átrio genital da fêmea, sendo este armazenado nas espermatecas.

O número de refeições sanguíneas por postura é variável consoante as espécies, podendo-se verificar ou não, concordância gonotrófica (Lucientes *et al.*, 2005).

### Oviposição

Para a oviposição (entre 30 a 70 ovos por postura), as fêmeas procuram locais abrigados, frescos e húmidos (entre 15,6°C e 26,7°C), como o solo de florestas, tocas de roedores, fissuras de paredes e muros, abrigos de animais peridomésticos, grutas e termiteiras, entre outros (Lane, 1993; Afonso & Alves-Pires, 2008).

Pensa-se que as fêmeas sejam inicialmente atraídas ao local de postura por características físico-químicas do substrato e posteriormente estimuladas a efectuarem a mesma pela presença de feromonas de ovos conspecíficos (Killick-Kendrick, 1999).

#### **1.1.4.2 - Bioecologia das formas imaturas**

Após a eclosão, as larvas alimentam-se de matéria orgânica, em decomposição, de diversas origens, animal e vegetal, e mesmo do revestimento externo dos ovos de onde provavelmente adquirirem simbiontes e parasitas das fêmeas adultas. Têm fraca mobilidade e permanecem no substrato a diferentes profundidades.

No final do quarto estágio, a larva deixa de se alimentar e procura um local mais seco para pupar, geralmente fixa-se a uma estrutura como uma folha seca ou uma pedra (Lawyer & Perkins, 2000).

A pupa é imóvel, não se alimenta, e dela eclode, ao fim de alguns dias, um imago, macho ou fêmea, recomeçando o ciclo.

### 1.1.5 - Importância em Medicina humana e veterinária

A importância médica dos flebotomíneos deve-se ao facto de as fêmeas serem hematófagas e potenciais vectoras de diferentes agentes patogénicos para as pessoas e/ou animais (Adler & Theodor, 1957), dos quais há a realçar os seguintes:

- Protozoários do Género *Leishmania* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) (ponto 1.2). Cerca de 70 espécies flebotomínicas são potencial ou comprovadamente vectoras deste parasita (Alexander & Maroli, 2003).

- *Bartonella bacilliformis*, uma proteobactéria responsável pela bartonelose humana ou doença de Carrion (febre de Oroya e verruga peruana), infecção limitada aos vales das montanhas Andinas na América latina (Bass *et al.*, 1997).

- Vários arbovírus, dos Géneros *Phlebovirus* (Família Bunyaviridae), *Orbivirus* (Família Reoviridae) e *Vesiculovirus* (Família Rhabdoviridae) (Comer & Tesh, 1991; Depaquit *et al.*, 2010).

Os flebótomos podem também ser agentes de doença, nomeadamente a Harara que é uma forte reacção alérgica causada pela picada em seres humanos.

De acordo com a classificação taxonómica utilizada (ponto 1.1.2), também o número de Géneros flebotomínicos com importância médica difere. Assim, seguindo a classificação de Lewis e colaboradores apenas dois Géneros, *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, são comprovadamente vectores de agentes patogénicos causadores de doenças humanas (OMS, 2010). Pela classificação apresentada no Quadro 1 (Rispaill & Léger, 1998; Léger & Depaquit, 2001; Galati, 1995 e 2003), vários Subgéneros de *Lutzomyia* foram elevados a Géneros e, como tal, seis novos Géneros (*Bichromomyia*, *Lutzomyia*, *Nyssomyia*, *Psychodopygus*, *Pintomyia* e *Migonemyia*) estão agora implicados na transmissão vectorial de *Leishmania* sp.

Actualmente, assiste-se ao fim do dogma de que no Velho Mundo apenas espécies do Género *Phlebotomus* têm importância médica pois a hipótese de espécies do Género *Sergentomyia* serem vectoras de *Leishmania* (Mutinga *et al.* 1994; Senghor *et al.*, 2011) e de vários arbovírus (Geevarghese *et al.*, 2005; Charrel *et al.*, 2006) é já sustentada por vários estudos.

Na região mediterrânica verifica-se a presença de *Leishmania* e dos três Géneros de arbovírus, referidos anteriormente. Está presente a circulação do vírus Toscana (isolado de *P. perniciosus*, *P. perfiliewi* e detectado RNA em *S. minuta*) responsável por meningites e meningo-encefalites estivais, dos vírus Sicília (isolado de *P. papatasi* e *P. ariasi*) e Nápoles (isolado de *P. perniciosus*, *P. perfiliewi* e *P. papatasi*) causadores da vulgarmente designada "febre por flebótomos" (febre papatacci ou febre dos 3 dias). Para além destes arbovirus, foram já isolados de flebótomos, nesta região, os flebovírus Adria, Arbia, Corfou, Massilia e Punique, e os Vesiculovírus Radi e Yug Bogdanovac. Contudo, à excepção do vírus Adria, suspeito de ser o agente causal de uma síndrome febril numa criança na Grécia (Anagnostou *et al.*, 2011), desconhece-se a possibilidade de estes vírus poderem causar doenças em humanos ou animais (Comer & Tesh, 1991; Depaquit *et al.*, 2010; Zhioua *et al.*, 2010; Papa *et al.*, 2011).

É ainda de realçar que o vírus Toscana foi isolado, pela primeira vez em humanos, a partir de um paciente que contraiu a infecção em Portugal, no Algarve (Ehrnst *et al.*, 1985), e que a presença dos vírus Nápoles e Sicília no país, apesar de suspeita já desde 1912 devido a um surto de febre papatacci ocorrido nesse ano (França, 1913), só foi comprovada por estudos serológicos em 1974 (Filipe, 1974).

## 1.2 - Leishmanioses

As leishmanioses são parasitoses causadas por protozoários pertencentes ao Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Género *Leishmania*. As diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas por espécies flebotomínicas e afectam seres humanos e/ou animais, tanto domésticos como silváticos (Campillo *et al.*, 1999).

Cerca de 20 espécies de leishmanias são patogénicas para o ser humano, podendo causar manifestações clínicas cutâneas, mucocutâneas e/ou viscerais e apesar de geralmente existir associação entre as espécies de *Leishmania* e a manifestação clínica correspondente, esta não é absoluta (Quadro 3) (Bañuls *et al.*, 2007).

**Quadro 3** - Espécies de *Leishmania* patogénicas para humanos (adaptado de OMS, 2010).

Subgénero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
<b>Velho Mundo</b>	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki<sup>b</sup></i> <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
<b>Novo Mundo</b>	<i>L. infantum<sup>a</sup></i>	<i>L. infantum<sup>a</sup></i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi<sup>b</sup></i> <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garhami<sup>b</sup></i> <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis<sup>c</sup></i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
<b>Tropismo</b>	<b>Viscerotrópica</b>	<b>Dermotrópica</b>	<b>Dermotrópica</b>	<b>Mucotrópica</b>

*a* = *L. chagasi*

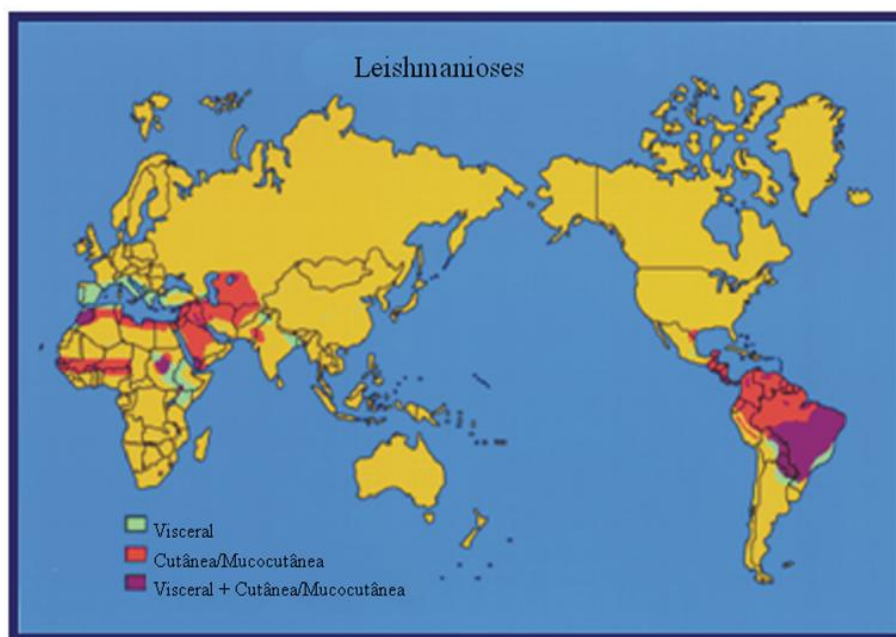
*b* - o estatuto de espécie encontra-se em discussão.

*c* - a posição taxonómica encontra-se em discussão.

### 1.2.1 - Epidemiologia

As leishmanioses são parasitoses, ainda negligenciadas, e endémicas em 98 países ou territórios (Fig. 7). Estima-se que a nível mundial existam 12 milhões de pessoas infectadas e mais de 350 milhões estão em risco de contrair estas zoonoses/antropozoonoses. Ocorrem, anualmente, cerca de meio milhão de novos casos de leishmaniose visceral e 1,5 milhões de leishmaniose cutânea (OMS, 2010).

Até recentemente, assumia-se que as leishmanioses estavam presentes em todos os continentes com excepção de Antártida e Austrália. Contudo, na Austrália foram já detectados casos de *Leishmania* sp. em macropodes (espécie de *Leishmania* não patogénica para humanos). Assim, o protozoário *Leishmania* está apenas ausente na Antártida (Rose *et al.*, 2004; Dougall *et al.*, 2009).



**Figura 7** - Distribuição mundial das leishmanioses humanas: cutânea, mucocutânea e visceral (adaptado de ParaSite, 2011).

A leishmaniose cutânea é causada por várias espécies dos Subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Quadro 3) e estima-se que 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Irão, Peru, Arábia Saudita e Síria. As manifestações mucocutâneas são causadas pela espécie *L. braziliensis* e, em casos menos frequentes, por *L. panamensis* (Subgênero *Viannia*), e encontram-se restritas na América Central e do Sul, ocorrendo 90% dos casos na Bolívia, Brasil e Peru (OMS, 2011).

A leishmaniose visceral é normalmente causada por espécies pertencentes ao complexo *Leishmania donovani*: *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *Leishmania chagasi* no Novo Mundo. Muitos autores consideram *L. chagasi* geneticamente indistinta de *L. infantum*, e pensa-se que o parasita tenha sido introduzido nas Américas durante o período dos descobrimentos. Estima-se que cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem no Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (OMS, 2011).

Na Bacia Mediterrânea foram identificados casos de leishmaniose causados por quatro espécies de *Leishmania*: *L. tropica*, *L. major*, *L. killicki* e *L. infantum*.

A leishmaniose cutânea por *L. tropica* é uma antropozoonose presente no Médio Oriente, Norte de África e Grécia (Garifallou *et al.*, 1984; Frank *et al.*, 1993) e é transmitida por *P. sergenti*. *L. major* é responsável pela leishmaniose cutânea de carácter zoonótico no Norte de África e Médio Oriente, sendo *P. papatasi* o vector e os roedores gerbilídeos reservatórios. Em relação a *L. killicki*, também agente de leishmaniose cutânea na Argélia, Tunísia e Líbia, desconhecem-se, até à data, os respectivos vectores e reservatórios (OMS, 2011).

*L. infantum* é a única espécie de *Leishmania* presente na Europa (com excepção da Grécia onde se verifica também *L. tropica*) e é o agente responsável pela maioria dos casos de leishmaniose visceral e cutânea, nesta região, e de leishmaniose visceral na restante Bacia do Mediterrâneo (OMS, 2010). Esta zoonose, em que o cão (*Canis lupus familiaris*) é o principal hospedeiro reservatório, afecta, na região, sobretudo crianças e adultos imunocomprometidos.

Para além do cão, outros animais podem actuar como reservatórios de *L. infantum* ou hospedeiros acidentais: O gato é considerado um hospedeiro secundário (Gramiccia & Gradoni, 2005; Maroli *et al.*, 2007) mas o número de casos de infecção destes animais, descritos em várias regiões do globo, sugere que este animal desempenhe um papel de reservatório habitual (Maia *et al.*, 2008 e 2010a). A raposa e canídeos selvagens são considerados os reservatórios em meio silvático (Rioux, 1968; Abranches *et al.*, 1983). Foram ainda detectados roedores (Bettini *et al.* 1980; Pozio *et al.*, 1985; Morillaz- Marquez *et al.*, 1985) e cavalos (Koehler *et al.*, 2002; Rolão *et al.*, 2005) infectados por *L. infantum*.

Em 1985, foi diagnosticado, pela primeira vez, um caso de co-infecção *Leishmania*/VIH (De la Loma, 1985). A co-infecção tornou-se uma grave preocupação no Sul da Europa (Portugal, Espanha, Itália e França), com até 70% dos casos de leishmaniose visceral em adultos associados a infecção por VIH (OMS, 2011), tendo-se colocado a hipótese dos doentes co-infectados actuarem como importantes reservatórios do parasita, e causando uma alteração do ciclo de transmissão zoonótica, predominantemente rural e periurbano, para antroponótica por transmissão mecânica, devido à partilha de agulhas infectadas, e também por transmissão vectorial (Alvar *et al.*, 1997; Campino *et al.*, 1997).

Pensa-se que o aumento da incidência da leishmaniose, que se assistiu no Sul da Europa, ter sido devido, maioritariamente, a esta co-infecção, em conjunto com o turismo, alterações climáticas e outros factores (Desjeux & Alvar, 2003). No entanto, a incidência e o número de recidivas diminuíram na segunda metade da década de noventa com a introdução da terapêutica antri-retroviral forte “HAART” (Fernandez Cotarelo *et al.*, 2003; Campino & Maia, 2010).

### **1.2.2 - Manifestações clínicas da infecção por *Leishmania* sp. em humanos**

Clinicamente, a doença em humanos apresenta três principais formas: cutânea, mucocutânea e visceral, que variam dependendo da espécie de *Leishmania* em causa e da resposta imunológica do indivíduo, entre outros factores:

- Leishmaniose cutânea: também conhecida como botão do Oriente, no Velho Mundo, é a forma mais comum da doença (Killick-Kendrick, 2010). Pode apresentar formas clínicas diversas desde lesões benignas, simples ou múltiplas, a lesões difusas, que dificilmente curam ou podem ser mesmo incuráveis (Campino & Abranches, 2002). Geralmente surgem nas zonas expostas do corpo, como a face, braços e pernas e, uma vez que deixam cicatrizes permanentes, podem ser causa de forte descriminação social (OMS, 2011).

- Leishmaniose mucocutânea ou espúndia: após um primeiro episódio de leishmaniose cutânea, ocorre a metastização com a destruição parcial ou total das membranas mucosas, nasal e oral, e tecidos adjacentes. A enorme desfiguração pode levar à exclusão social (OMS, 2011).

- Leishmaniose visceral ou Kala-azar: neste caso, os parasitas invadem as células do sistema fagocítico-mononuclear do baço, medula óssea e fígado. É caracterizada por acessos irregulares de febre, cefaleias, perda de peso, anemia (que pode ser grave), hiperglobulinemia e hepatosplenomegalia (Dedet, 1994). Esta forma da doença pode ser fatal se não for tratada (OMS, 2011).



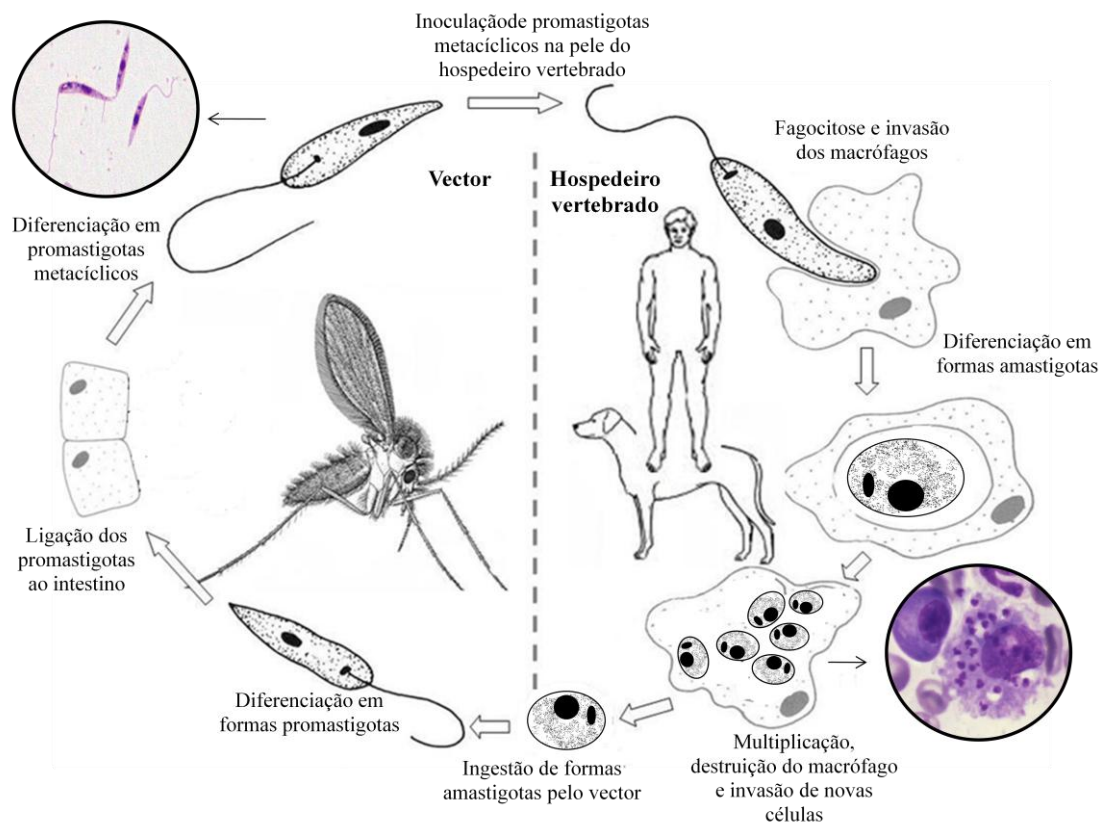
### 1.2.3 - Manifestações clínicas da infecção por *L. infantum* em cães, raposas e gatos

Como foi referido, o cão é o principal reservatório doméstico de *L. infantum*. Neste, a infecção pode causar uma doença sistémica grave, que pode ser fatal na ausência de tratamento (OnLeish, 2011). A sintomatologia é variável, dependendo de múltiplos factores como o estado imunitário do animal, a estirpe de *Leishmania* em causa, a fase evolutiva da doença e os órgãos afectados. Apresenta geralmente envolvimento viscerocutâneo e a presença de elevado número de parasitas na pele favorece a transmissão pelo insecto vector (Pereira, 2008). Estima-se que cerca de 50% dos cães infectados sejam assintomáticos. Entre as manifestações clínicas, as mais comuns são linfadenopatias e lesões cutâneas. É também possível observar perda de peso, caquexia, polidipsia, hipertermia, anorexia, conjuntivite, esplenomegalia, epistaxe, onicogribose, queratite, pneumonia, diarreia, melenas, rinite, ictérica, uveíte, sinais musculoesqueléticos e cardiovasculares e lesões nas membranas mucosas (Cardoso, 2004).

As raposas infectadas, contrariamente ao que se verifica nos cães, raramente apresentam manifestações (Abranches *et al.*, 1984).

No gato, as manifestações clínicas, quando ocorrem, são sobretudo cutâneas, podendo ser localizadas, como nódulos, pápulas e úlceras, principalmente na zona da cabeça (nariz, orelhas e região ocular) ou dermatite generalizada, alopecia e descamação. A forma clínica visceral é rara, podendo no entanto ocorrer linfadenomegalia (Gramicia & Gradoni, 2005).

### 1.2.4 - Ciclo de vida de *Leishmania* e tipos de transmissão



**Figura 8** - Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

(adaptado de Beran, 2010, CDC, 2011a e de LeishRisk, 2011).

O ciclo (Fig. 8) é mantido entre o vetor e o reservatório, e dependendo da espécie de *Leishmania* em causa, a transmissão é zoonótica ou antroponótica, consoante o reservatório é animal ou humano, respectivamente. É um parasita digenético que apresenta, fundamentalmente, duas formas morfológicas: a forma promastigota (flagelada e extracelular) no hospedeiro invertebrado ou vetor, e a forma amastigota (sem flagelo e intracelular) no hospedeiro vertebrado (Bañuls *et al.*, 2007).

O vetor infecta-se ao efectuar uma refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado infectado, de onde ingere as formas amastigotas do parasita. No tubo digestivo do insecto, o parasita diferencia-se na forma promastigota e passa por uma série de transformações e multiplicações, até que novos promastigotas metacíclicos são formados (ponto 1.2.4.1). A transmissão ocorre quando a fêmea de flebotomo, infectante, tenta efectuar nova refeição sanguínea, inoculando simultaneamente as

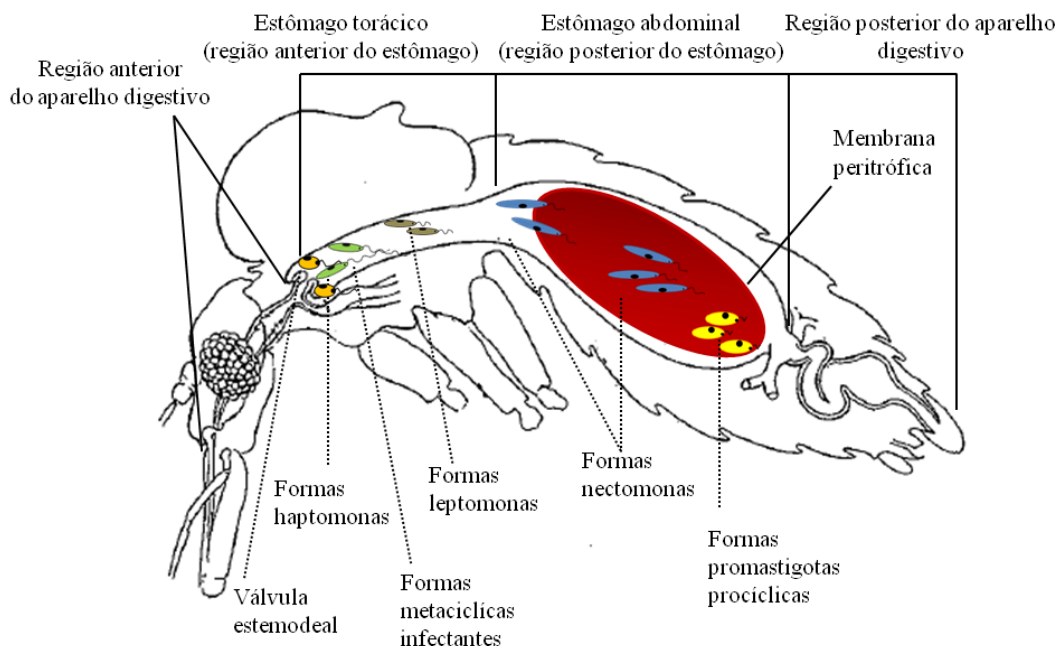
formas promastigotas metacílicas na pele do hospedeiro vertebrado. Neste, os parasitas são fagocitados e invadem monócitos e macrófagos, onde, no interior de fagolisossomas, se diferenciam em formas amastigotas, que se dividem por cissiparidade até que a célula eventualmente rebenta e o protozoário, agora livre, infecta novas células fagocitárias. A replicação e destruição das células repetem-se continuamente até que sejam controladas pela resposta imune do hospedeiro ou por tratamento. O ciclo reinicia-se quando uma outra fêmea flebotomínica efectua a sua refeição sanguínea no vertebrado infectado (CDC, 2011b).

Segundo Killick-Kendrick (1999) para que uma espécie flebotomínica possa ser incriminada como vectora é necessário que obedeça a cinco critérios:

- 1- A espécie tem de se alimentar no ser humano e no caso de uma zoonose tem de se alimentar também no animal reservatório.
- 2- Tem de estar presente na mesma região geográfica onde ocorre a doença.
- 3- A fêmea tem de ser capaz de suportar o desenvolvimento do parasita após a refeição sanguínea digerida e excretada.
- 4- Os parasitas encontrados no flebótomo, na Natureza, têm de ser semelhantes aos isolados de pacientes.
- 5- A fêmea tem de ser capaz de transmitir o parasita por picada.

Para além da transmissão vectorial, conhecem-se outras formas de transmissão de *Leishmania* menos comuns, como a transmissão congénita, transmissão por transfusão sanguínea, por partilha de agulhas infectadas e transmissão venérea (rara) (Killick-Kendrick, 1999). A possibilidade de outras espécies de artrópodes, como por exemplo as carraças e insectos ceratopogonídeos, poderem transmitir o parasita tem também sido colocada como hipótese (Coutinho *et al.*, 2005; Dantas Torres, 2011; Dougall *et al.*, 2011). A capacidade do parasita se desenvolver nestes artrópodes apenas foi comprovada para uma espécie de *Leishmania* em ceratopogonídeos na Austrália.

#### 1.2.4.1 - Desenvolvimento intravectorial de *Leishmania* sp.



**Figura 9** - Ilustração do aparelho digestivo de um flebótomo fêmea e desenvolvimento intravectorial de *Leishmania* sp. (adaptado de Schlein, 1992 e de Afonso & Alves-Pires, 2008).

O ciclo intravectorial inicia-se quando uma fêmea flebotomínica efectua uma refeição sanguínea e ingere, por picada, as formas amastigotas do parasita, presentes no hospedeiro infectado (Fig. 9).

O sangue ingerido passa para a região abdominal do estômago onde rapidamente é rodeado pela membrana peritrófica (Sacks, 2001). Esta matriz quitinosa acelular é segregada pelo insecto e para além de facilitar a digestão, tem uma função protectora impedindo que o epitélio intestinal sofra danos mecânicos e químicos (resultantes da ingestão de sangue e processo digestivo) e actua como barreira a agentes infecciosos (Lehane, 1997).

Na referida região, após 18-24 horas, dá-se a transformação em promastigotas procíclicas (curtos e ovóides, com um pequeno flagelo) que se dividem activamente por cissiparidade (primeira fase de multiplicação intravectorial). Após dois a quatro dias, a multiplicação abrande e diferenciam-se em formas flageladas, longas e delgadas, as

nectomonas, que migram após a ruptura da membrana peritrófica, e ligam-se pelos flagelos às microvilosidades da parede intestinal.

O local de fixação ao epitélio intestinal difere para os dois Subgêneros de *Leishmania*: nas espécies do Subgênero *Leishmania* o parasita liga-se ao nível do estômago (Suprapilária), enquanto para as espécies do Subgênero *Viannia*, apesar de alguns se ligarem a este nível, a maioria migra para a região peripilórica, onde se fixam (Peripilária) (Léger & Depaquit, 2001; Bates, 2007).

Após quatro a sete dias, com a maioria do sangue excretado (diurese), as nectomonas movem-se anteriormente para a válvula estemodeal onde se fixam à membrana quitinosa, através de hemidesmossomas produzidos na membrana do flagelo, e transformam-se em formas leptomonas, mais curtas, que retomam a multiplicação (segunda fase de multiplicação intravectorial).

A válvula tem como função impedir que o sangue ingerido retroceda no canal alimentar. A libertação de quitinasas, por parte do parasita, vai danificá-la impedindo o seu normal funcionamento (Volf *et al.*, 2004) e a secreção de um gel dá origem a um “rolhão” que dificulta a passagem do sangue para o estômago (Rogers *et al.*, 2002; Stierhof *et al.*, 1999). Pensa-se que estas alterações favoreçam a transmissão de duas formas distintas: por um lado a válvula danificada permite a regurgitação de formas metacíclicas na pele do hospedeiro, de cada vez que a fêmea se tenta alimentar, considerando-se ser esta a forma mais usual de transmissão por picada (Killick-Kendrick, 2002); por outro, o flebótomo com a válvula danificada fica impossibilitado de se alimentar adequadamente, pelo que irá efectuar um maior número de picadas na tentativa de concretizar a refeição, e terá assim maior probabilidade de transmitir o parasita (Schlein *et al.*, 1992).

A infecção da válvula estemodeal é por vezes acompanhada pela invasão da região anterior do tubo digestivo, incluindo faringe, cibário e probóscis, e em alguns casos observaram-se promastigotas metacíclicos nas glândulas salivares (Killick-Kendrick, 2002).

Ao fim de cinco a sete dias, as leptomonas transformam-se em promastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado. Estas formas, com longos flagelos, não se dividem e têm a capacidade de se evadirem à resposta

imune do hospedeiro vertebrado. Nesta fase do ciclo, é também possível observar formas haptomonas ligadas à válvula estemodeal, cuja forma precursora é desconhecida (Ramalho-Ortigão *et al.*, 2010).

Com a transformação em formas metaciclícas fica concluída a metaciclologénese (sete a nove dias). Os parasitas são inoculados num hospedeiro vertebrado quando a fêmea tenta realizar uma nova refeição sanguínea, mantendo-se, assim, o ciclo. A transmissão é cíclica evolutiva e multiplicativa.

Ao longo do desenvolvimento intravectorial, os parasitas são confrontados com diversas barreiras físico-químicas, das quais se destacam a acção das enzimas digestivas, a necessidade de escaparem da membrana peritrófica e de se ligarem ao epitélio intestinal para não serem excretados juntamente com os produtos da digestão do sangue. Pensa-se assim, que tenha ocorrido uma forte co-evolução vector/parasita suportada pelo facto de as espécies flebotomínicas vectoras apenas permitirem o desenvolvimento de uma (vector restrito), ou de um pequeno número de espécies de *Leishmania* (vector permissivo), e de que apesar da existência de um grande número de espécies de flebótomos apenas algumas são vectoras competentes do protozoário (Sacks & Kamhawi, 2001).

### 1.3 - Flebótomos em Portugal

O estudo dos flebótomos, em Portugal, teve início em 1912, ano em que o Doutor Carlos França, médico, parasitologista e bacteriologista português, e considerado o primeiro entomologista médico no país, assinalou pela primeira vez em Colares (Sintra) a presença de *Phlebotomus* (*Phlebotomus*) *papatasi* Scopoli, 1786 (França, 1913) na sequência de um surto de febre papatacci ocorrido no país. Em 1918, este Ilustre Cientista assinalou duas novas espécies também capturadas na mesma região, *Phlebotomus* (*Larroussius*) *perniciosus* Newstead, 1911 (a que chamou na altura *P. lusitanicus*), e *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *sergenti* Parrot, 1917 (França, 1918; Afonso *et al.*, 2007).

Somente nos anos 40 do Século XX, os estudos flebotomínicos foram retomados sob a orientação do Professor Doutor Fraga de Azevedo, centrados sobretudo na área de

Lisboa (Azevedo, 1946) e onde foram assinaladas, pela primeira vez, a presença das espécies *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921 e *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* (Rondani, 1843) (Meira & Ferreira, 1944). Os referidos autores estudaram alguns aspectos da distribuição (assinalaram a presença de flebotomos na Covilhã, Alcáçovas e Alcácer do Sal), da fenologia e da ecologia das espécies portuguesas. As preferências hemáticas, das fêmeas capturadas, foram analisadas pela técnica da reacção das precipitinas e morfologia dos glóbulos vermelhos, e a taxa de infecção, por *Leishmania*, por dissecção do aparelho digestivo (Ferreira & Ferreira, 1944; Ferreira, 1945; Azevedo & Teixeira, 1946). Apesar de terem sido detectadas formas metacíclicas no aparelho digestivo de fêmeas, a cultura dos parasitas não teve sucesso durante este período.

Em 1957, o Doutor Rés assinalou a presença de flebotomos na Bacia Hidrográfica do Douro e Guadiana (Rés, 1957).

A partir de 1979 (Pires, 1979), o conhecimento da distribuição e bioecologia das espécies, presentes no país, bem como a sua importância médica, sofreu um enorme impulso com os estudos realizados pelo Doutor Carlos Alves Pires, Investigador do IHMT, UNL. O referido Investigador, assinalou a presença de flebotomos num grande número de novas localidades e regiões, incluindo a Ilha da Madeira (Alves-Pires & Capela, 1996; Alves-Pires *et al.*, 1997), e efectuou numerosos trabalhos particularmente no que se refere aos três principais focos de leishmaniose em Portugal: Trás-os-Montes e Alto Douro, Grande Lisboa / Arrábida e Sotavento Algarvio. Novos métodos de captura foram utilizados, como papéis impregnados com óleo de rícino e armadilhas luminosas do tipo CDC e Jersey. Até então, as capturas eram realizadas somente com tubos de vidro e aspiradores manuais, sendo necessário visualizar os insectos para directamente os capturar. Para análise das preferências hemáticas das fêmeas, utilizou, pela primeira vez no país, a técnica de ELISA (“Enzyme-linked immunosorbent assay”) (Alves-Pires *et al.*, 1992; Pires, 2000).

Com a detecção de formas metacíclicas de *Leishmania* na válvula estemodeal de *P. perniciosus* e *P. ariasi*, seguida da cultura dos parasitas e identificação de *L. infantum* demonstrou-se, definitivamente, que as referidas espécies flebotomínicas são comprovadamente vectoras, em Portugal (Pires, 1984). Isolou-se o zimodeme MON-1,

a partir de ambas as espécies, e o MON-24 foi isolado, pela primeira vez na Europa em flebotomos, a partir de fêmeas de *P. ariasi* capturadas no Alto Douro (Alves-Pires *et al.*, 1991). Estes estudos foram efectuados com a colaboração dos Professores Doutores Pedro Abranches e Lenea Campino da Unidade de Leishmanioses do IHMT, UNL.

A partir dos anos 90, até á presente data, os estudos do Doutor Carlos Pires prosseguiram, em várias regiões, em colaboração com a Professora Doutora Maria Odete Afonso, UEI PM, UPM, IHMT, UNL, Professora Doutora Lenea Campino e colaboradores, UEI PM, IHMT, UNL, Prof. Doutor Saúl Semião-Santos, Universidade de Évora, Professores Doutores Manuela Rodrigues e Luís Cardoso, UTAD (Alves-Pires *et al.*, 2001; Afonso *et al.*, 2005; Afonso *et al.*, 2007, Alves-Pires *et al.*, 2008).

Recentemente, as técnicas moleculares, como a reacção em cadeia da polimerase (“PCR”), foram introduzidas no estudo da infecção flebotomínica por *Leishmania* (kDNA- PCR e ITS1-PCR) e na identificação das refeições sanguíneas (Cit b- PCR seguido de sequenciação) (Maia *et al.*, 2009; Mendonça, 2011).

### 1.3.1 - Bioecologia das espécies flebotomínicas portuguesas

Até à presente data, dois Géneros e cinco espécies flebotomínicas foram assinaladas no país:

#### I- Género *Phlebotomus* Rondani & Berté, 1840

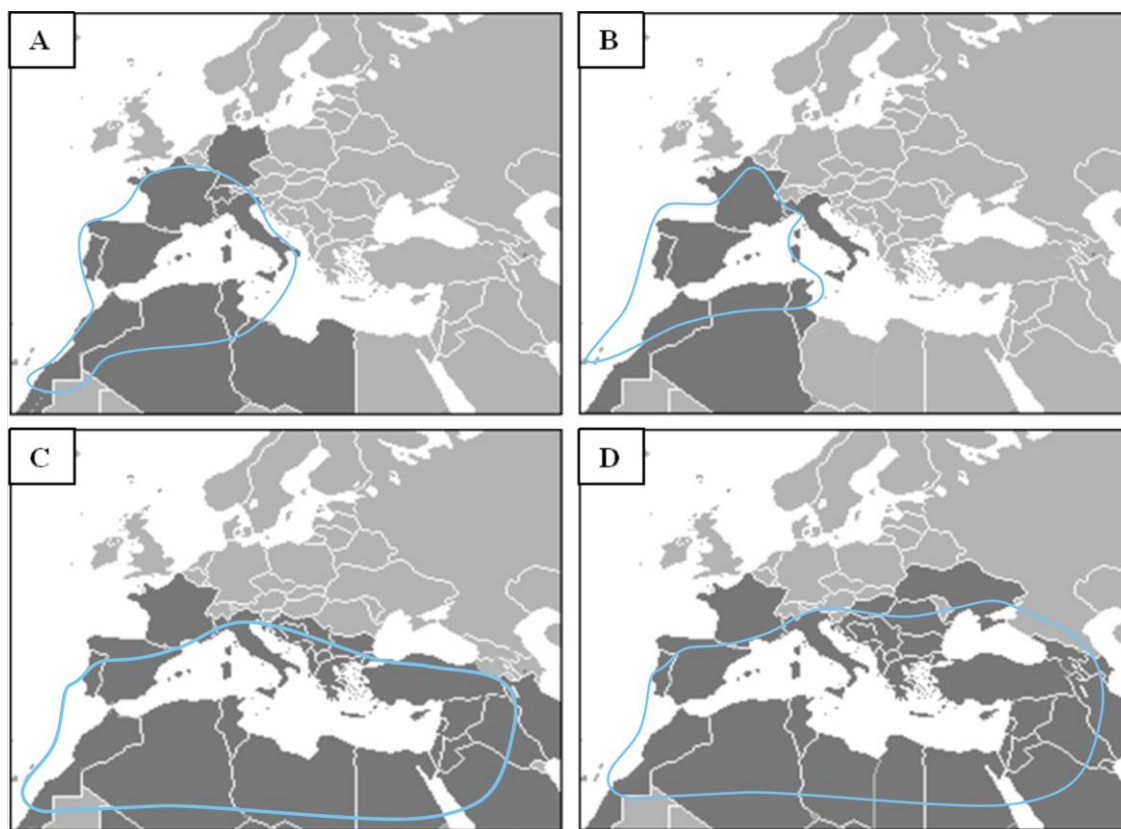
- *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* (Scopoli, 1786)
- *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921
- *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* Newstead, 1911
- *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917

#### II- Género *Sergentomyia* França & Parrot, 1920

- *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* (Rondani, 1843)

Para o Género *Phlebotomus*, a distribuição destas espécies na Europa e Bacia Mediterrânica pode ser observada na Figura 10.





**Figura 10** - Distribuição Europeia e Mediterrânica das várias espécies, do Género *Phlebotomus*, assinaladas em Portugal: A - *P. perniciosus*, B - *P. ariasi*, C - *P. sergenti* e D - *P. papatasi* (adaptado de Depaquit *et al.*, 1998a e de Depaquit *et al.*, 2010).

As espécies apresentam marcada sazonalidade, verificando-se flebótomos adultos a partir de Abril/Maio até Outubro/Novembro (Alves-Pires & Ribeiro, 1991; Pires, 1985; Pires, 2000), cessando a sua actividade a temperaturas inferiores a 12°C. Os ciclos variam de monofásicos a difásicos (um ou dois picos de eclosão dos imagos), consoante a espécie, região ou ano de estudo (Meira & Ferreira, 1944; Rés, 1957; Pires, 2000; Afonso *et al.*, 2005).

Todas apresentam concordância gonotrófica e é frequente a associação de várias espécies flebotomínicas nos mesmos locais de captura (Pires, 2000). As abundâncias relativas das diferentes espécies, registadas a partir de diferentes estudos realizados em Portugal, estão apresentadas no Quadro 4.

**Quadro 4** - Abundância relativa das várias espécies flebotomínicas capturadas em Portugal.

Região	Referências	Abundância relativa (%)					Nº total flebótomos	método de captura
		<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>P. papatasi</i>	<i>S. minuta</i>		
Distrito Vila Real								
Alto Douro	Rés, 1957	53,6	46,2	1 macho	0	0,07	5717	aspirador manual
Alto Douro	Alves-Pires & Ribeiro, 1991; Pires, 2000	31,8	62,3	0	0	5,9	5406	CDC/papéis adesivos
Alijó	Afonso <i>et al.</i> , 2007	19	73,1	0	0	7,9	4828	CDC
Distrito de Coimbra								
Coimbra	Pereira <i>et al.</i> , 2009	69	23,4	0,3	0	7,3	992	CDC
Distrito Lisboa								
Colares	França, 1913	26,5	0	73,5	0	0	102	
Colares	Meira & Ferreira, 1944	75	12,5	12,5	0	0	8	tubo de ensaio
Lisboa	Azevedo, 1946	89,4	1,1	1,7	0	7,8	3666	tubo de ensaio
Lisboa	Ferreira & Ferreira, 1944	96,7	0,4	0,2	0	2,7	4070	tubo de ensaio
Lisboa	Meira & Ferreira, 1944	89,1	0,4	4,9	0	5,6	1002	tubo de ensaio
Lisboa	Rés, 1957	75	5,4	17,1	0	2,5	1282	aspirador manual
Lisboa	Afonso <i>et al.</i> , 2004	80,33	19,06	0,61	0	0	488	CDC
Distrito Setúbal								
Arrábida	Pires, 1985; Pires, 2000.	56	41,9	0	0	2,1	1662	Aspirador manual
Arrábida	Afonso <i>et al.</i> , 2005	58,65	13,83	0,45	0	27,07	665	CDC
Arrábida	Amaro, 2010	94	2	4	0	0	4931	CDC
Alcácer do Sal	Azevedo, 1946	95,2	0,7	0	0	0,7	148	tubo de ensaio
Distrito Évora								
Évora	Semião Santos <i>et al.</i> , 1995	36,5	9,4	42,1	0	12	159	CDC
Évora	Alves-Pires <i>et al.</i> , 2004	23,2	0	72,9	0	3,9	639	CDC
Mourão	Rés, 1957	10	0	29,1	60,9	0	110	aspirador manual
Alcáçovas	Azevedo, 1946	95,4	0	0	0	1	196	tubo de ensaio
Alqueva	Maia <i>et al.</i> , 2010b	86,73	4,59	4,59	1,53	2,56	196	CDC
Distrito Beja								
Serpa e Moura	Rés, 1957	97,74	0	1,13	1,13	0	177	aspirador manual
Distrito Faro								
Algarve (Sotavento)	Pires, 2000; Alves-Pires <i>et al.</i> , 2001	51,5	0,8	8,7	0,03	39	3093	CDC/papel adesivo/aspirador
Algarve	Schrey <i>et al.</i> , 1989	79,5	0,1	1,5	0	18,9	1710	CDC/aspirador
Algarve	Maia <i>et al.</i> , 2009	90,51	0,84	2,11	0,21	6,33	474	CDC
Algarve	Amaro, 2010	93	3	3	3	3	2647	CDC
Algarve	Mendonça, 2011	86,3	2,5	0,7	0	10,5	1595	CDC
Algarve	Maia <i>et al.</i> , 2011	86,38	1,3	10,32	0,26	1,73	1153	CDC

### *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* Newstead, 1911

Esta espécie, comprovadamente vectora de *L. infantum* em Portugal, distribui-se de Norte a Sul do país (Fig.11). Encontra-se muitas vezes associada às actividades humanas e foi já capturada numa grande variedade de biótopos como habitações humanas e abrigos animais de várias espécies, tanto domésticos como silváticos (no interior e exterior), e em meios urbanos e rurais, embora se assuma a sua preferência por abrigos de animais peridomésticos em zonas rurais (Meira & Ferreira, 1944; Pires, 1979; Alves-Pires & Ribeiro, 1991).

Em termos bioclimáticos, apresenta preferência por regiões sub-húmidas a semi-áridas, podendo, no entanto, tolerar outros tipos de clima (Rioux *et al.*, 1984; Rioux, 2001).

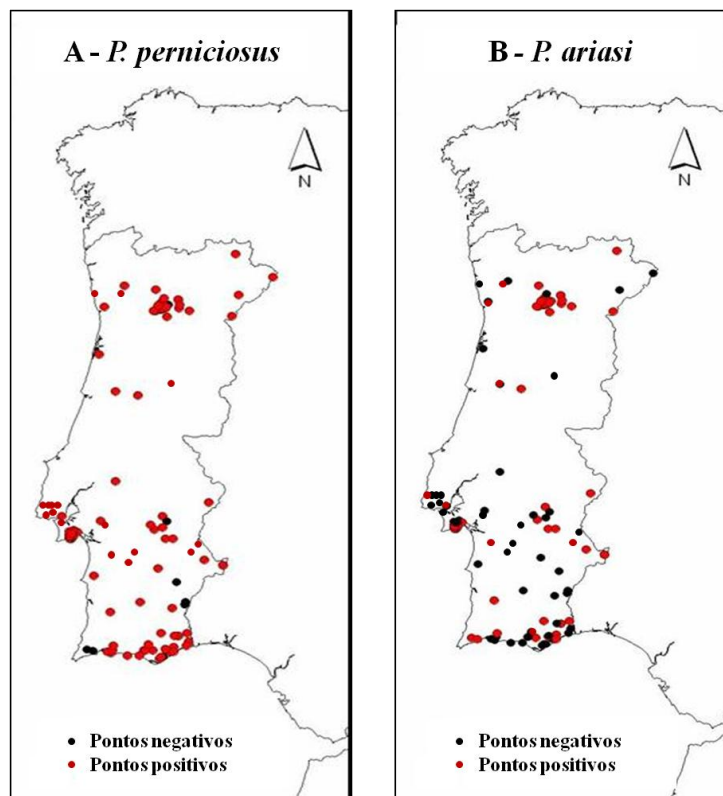
Até à data, é a espécie mais abundante em Portugal (Quadro 4), sendo apenas suplantada por *P. ariasi* nas regiões de elevada humidade e temperaturas inferiores de Trás-os-Montes e Alto Douro, e por *P. sergenti* na região árida de Évora (Semião-Santos *et al.*, 1995; Alves-Pires *et al.*, 2004). No que diz respeito aos hospedeiros vertebrados preferenciais, já se detectaram fêmeas alimentadas em humanos, cães, gatos, aves, porcos, cavalos, roedores e bovinos (Ferreira & Ferreira, 1944; Ferreira, 1945; Azevedo & Teixeira, 1946; Alves-Pires *et al.*, 1992; Mendonça, 2010).

Apresenta desenvolvimento larvar a uma temperatura óptima de 25°C e a uma temperatura mínima de 0°C. Em Portugal, encontra-se geralmente abaixo da cota dos 600 m (Afonso & Alves-Pires, 2008).

#### *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921

Esta espécie é, juntamente com *P. perniciosus*, vectora de *L. infantum* em Portugal (Fig.11). Geralmente, é capturada em habitats peridomésticos rurais e em áreas silváticas podendo, mais raramente, surgir em habitações humanas ou próximo das mesmas (Pires, 1979 e 2000). É uma espécie com preferência por bioclimas húmidos e sub-húmidos (Rioux *et al.*, 1984; Rioux, 2001), podendo tornar-se dominante, em relação a *P. perniciosus*, no primeiro, como se tem verificado na região de Trás-os-Montes e Alto Douro (Alves-Pires & Ribeiro, 1991; Afonso *et al.*, 2007). É de realçar que, na região da Arrábida, os estudos anteriormente efectuados apontam para que seja predominantemente exofílica e associada ao ciclo silvático de transmissão de *Leishmania*, enquanto *P. perniciosus* (espécie endofílica nesta área) se encontra associada ao ciclo doméstico (Pires, 1988). Da análise das refeições sanguíneas realizadas no país, estima-se que *P. ariasi* se alimente em humanos, cães, aves e répteis, entre outros animais (Alves-Pires *et al.*, 1992; Mendonça, 2010).

O desenvolvimento larvar verifica-se a temperaturas compreendidas entre os 5° e 30°C (Rioux *et al.*, 1985) e, em Portugal, *P. ariasi* encontra-se, geralmente, até aos 600 m de altitude (Afonso & Alves-Pires, 2008).



**Figura 11** - Pontos de amostragem para flebótomos em Portugal Continental e respectiva presença/ausência das espécies comprovadamente vectoras de *L. infantum*: A - *P. perniciosus*, B - *P. ariasi* (adaptado de Afonso *et al.*, 2006, Pires, 1979 e dos trabalhos citados no Quadro 4).

*Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917

É uma espécie vectora de *L. tropica* no Norte de África, Médio Oriente e subcontinente Indiano (Killick-Kendrick, 1990).

Geralmente, é capturada em biótopos onde se verifica a existência de seres humanos nomeadamente, em habitações humanas ou nas suas proximidades (Meira & Ferreira, 1944; Rés, 1957; Pires, 1979). Apesar de apresentar preferência por bioclimas semiáridos a áridos, pensa-se que possui alguma plasticidade climática (Rioux *et al.*, 1984; Rioux, 2001).

Em Portugal, as maiores abundâncias são observadas no Alentejo (Quadro 4), sendo a sua presença a Norte do Tejo, com a excepção da região de Lisboa, considerada rara, tendo sido apenas capturado um único exemplar no Alto Douro (Rés, 1957) e outro

em Coimbra (Pereira *et al.*, 2009 e 2010). Foi ainda assinalada, a sua presença, na Ilha da Madeira no Funchal (Alves-Pires & Capela, 1996).

Para o desenvolvimento larvar, esta espécie prefere temperaturas compreendidas entre os 31°-33°C e os adultos preferem humidades relativas entre 0-45% (Singh, 1999). Tal como as espécies anteriormente referidas, em Portugal, encontra-se geralmente abaixo da cota dos 600 m.

*Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi* (Scopoli, 1786)

Vector comprovado de *L. major* na Ásia Central e do Sul e no Norte de África, é considerada uma espécie rara em Portugal. Apesar de ter sido capturada em 1912 em Lisboa (França, 1913), desde essa data as capturas apenas tiveram sucesso no Sul do país (Algarve e Alentejo), apresentando baixas densidades e preferencialmente na proximidade de habitações humanas (Rés, 1957; Pires, 2000). Da análise das refeições sanguíneas, do pequeno número de fêmeas capturadas no país, verificou-se que a maioria se havia alimentado em humanos (Pires, 2000).

Apresenta preferência por bioclimas áridos e sobretudo hiper-áridos, sendo rara nos bioclimas húmido, sub-húmido e peri-árido (Rioux *et al.*, 1984; Rioux, 2001).

O desenvolvimento larvar pode ocorrer entre os 4°-40°C mas apresentando uma temperatura preferencial entre 28°-34°C. Os adultos preferem humidades relativas entre os 36-45% e altitudes até aos 1000 m (Killick-Kendrick, 1999).

*Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* (Rondani, 1843)

Apresenta grande plasticidade de habitats, sendo capturada em ambientes rurais e urbanos e tanto em meios domésticos e peridomésticos como silváticos. No Norte, onde não é muito frequente, e no Centro do país, aparenta ter preferência por casas de habitação, canis e pocilgas, e no Sul, por poços e capoeiras (Pires, 1979 e 2000).

Em termos bioclimáticos prefere regiões sub-húmidas a periáridas (Rioux *et al.*, 1984; Rioux, 2001).

Tal como as restantes espécies do Género *Sergentomyia*, é uma espécie predominantemente herpetófila e pensa-se que, em Portugal, os seus hospedeiros preferenciais sejam *Tarentola mauritanica* Linnaeus, 1758 e *Hemydactillus turcicus* Linnaeus., 1758, aos quais pode transmitir *Sauroleishmania tarentolae* (Rioux *et al.*, 1969; Pozio *et al.*, 1986; Pires, 2000).

#### 1.4 - Leishmanioses em Portugal

Em Portugal, a leishmaniose humana, visceral e cutânea, é uma zoonose causada por *L. infantum* e em que *P. perniciosus* e *P. ariasi* são os vectores comprovados (Pires, 1984). A doença é conhecida, no país, desde 1910 (Alvares, 1910) e a partir dos anos 50, devido à sua elevada incidência tornou-se uma doença de declaração obrigatória (Campino *et al.*, 2006).

O cão doméstico é o principal reservatório do parasita e a leishmaniose canina é uma parasitose de elevada importância veterinária, estimando-se que cerca de 6% dos cães de Portugal Continental estejam infectados, apresentando uma seroprevalência que excede os 15% em algumas regiões (OnLeish, 2010). Coloca-se a hipótese de que os gatos (*Felis silvestris catus*) possam também actuar como reservatórios do protozoário em meio doméstico (Maia *et al.*, 2010a). A raposa (*Vulpes vulpes*) é considerada um reservatório silvático (Abranches *et al.*, 1983).

A prevalência da infecção canina não é uniforme no país, tendo-se verificado nas décadas de 80/90 a existência de três focos zoonóticos considerados clássicos, nomeadamente a região de Trás-os-Montes e Alto Douro, a região metropolitana de Lisboa e a região do Algarve (Abranches & Pires, 1980; Campino *et al.*, 1995). A região de Évora foi considerada um foco de leishmaniose canina (Semião-Santos *et al.*, 1995), mas no rastreio mais recente (2009), a seroprevalência canina no Distrito, foi inferior a 5% (OnLeish, 2010).

A emergência do VIH/SIDA alterou, como em vários países do Sul da Europa, a epidemiologia da leishmaniose visceral humana em Portugal, que deixou de ser uma doença predominantemente infantil, para estar associada a casos de co-infecção em adultos imunocomprometidos. De 2000 a 2009, foram diagnosticados, no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 173 novos casos em humanos, 66 em adultos e crianças

imunocompetentes e 107 em adultos imunocomprometidos e, contrariamente ao que se observou em Espanha, Itália e França, a incidência não diminui com a introdução da terapêutica antiretroviral “HAART” (Campino & Maia, 2010).

Das estirpes de *L. infantum* isoladas em Portugal, e analisadas por tipagem isoenzimática (“multilocus enzyme electrophoresis”), verificou-se que, à semelhança do que se observa na restante Bacia Mediterrânica, MON-1 é o zimodeme mais frequente de Norte a Sul do país (97% dos isolados) e a principal causa de leishmaniose humana e canina (Campino *et al.*, 2006). MON-24, MON-29, MON-80 foram isolados a partir de adultos com co-infecção VIH/SIDA (Campino *et al.*, 2006) e no Alto Douro foi descrito um caso isolado de MON-98 num cão (Cardoso *et al.*, 2002). Em flebótomos foram detectados, até à data, os zimodemes MON-1 (Alves-Pires *et al.*, 2001) e MON-24 (Alves-Pires *et al.*, 1991).

### **1.5 - Alterações climáticas, flebótomos e transmissão vectorial de *Leishmania* sp.**

Os flebótomos são os agentes focalizadores da doença e a transmissão vectorial depende fundamentalmente das abundâncias e sobrevivência dos vectores, das taxas de picada, da duração da estação de actividade dos imagos/diapausa larvar e do período extrínseco de desenvolvimento dos agentes patogénicos. Todos estes aspectos são condicionados pelo clima, principalmente pela temperatura e humidade relativa (Afonso & Alves-Pires, 2008). Durante o Século XX, verificou-se um aumento da temperatura média dos oceanos e da atmosfera terrestre de 0,74°C, a um ritmo mais acelerado do que seria esperado unicamente por causas naturais. Assume-se que estes aumentos sejam, sobretudo, devido aos aumentos das concentrações de gases com efeito de estufa, de causas antropogénicas, cuja tendência deverá manter-se nos anos futuros (IPCC, 2007).

O aumento da temperatura média global, causado pelas alterações climáticas, poderá levar à expansão geográfica dos vectores flebotomíneos para latitudes mais a Norte e para altitudes mais elevadas. Em áreas endémicas, os flebótomos poderão aumentar o seu período de actividade, o número de gerações anuais e a sua densidade, ao mesmo tempo que poderá ocorrer a diminuição do período extrínseco do agente

infeccioso (Ready, 2008). O clima afecta igualmente a distribuição de outras espécies hospedeiras, a vegetação local e os padrões de exposição humana à picada.

Recentemente, verificou-se um aumento da incidência de casos de leishmaniose em alguns países e foram detectadas novas áreas endémicas em regiões onde, até então, não tinham sido assinalados casos autóctones. Assume-se que, estas alterações não se verificaram apenas por melhorias desenvolvidas na investigação, no diagnóstico, ou no registo de casos (OMS, 2003). Assim, para a Europa, e para outras regiões do globo, pensa-se que a expansão a que actualmente se assiste das espécies flebotomínicas vectoras bem como o aumento da incidência da doença possam ser devidos ao aquecimento global, em conjunto com outros factores, como alterações no uso dos solos e movimentação de pessoas e animais de áreas endémicas. Esta tendência observa-se, por exemplo, no Norte de Itália (Kuhn, 1999; Ferroglia *et al.*, 2005; Maroli *et al.*, 2008), na Alemanha (Gothe *et al.*, 1997; Bogdan, 2001; Naucke *et al.*, 2008), em França (Dereure *et al.*, 2009) e possivelmente na Hungria (Farkas *et al.*, 2011).

Em Portugal, de acordo com os resultados obtidos por técnicas geostatísticas e baseadas em dados recolhidos entre 1978 e 2004, em 104 localidades, as áreas de maior risco para a presença das espécies comprovadamente vectoras são o Noroeste e o Algarve para *P. perniciosus* e o Nordeste para *P. ariasi* (Baptista *et al.*, 2007).

Em anos recentes, foram realizados estudos sobre o possível efeito das alterações climáticas sobre estas duas espécies e respectivo risco de transmissão de *L. infantum* no território nacional. Com os cenários projectados pelos projectos SIAM (“Scenarios, Impacts and Adaptation Measures” I e II), é esperado um aumento da temperatura de 3,3°C até ao ano 2040 e um aumento de 5,8°C até 2090. Estima-se que estas alterações se reflectam num aumento do período de actividade de *P. perniciosus* em todo o país, com consequente aumento do período favorável à transmissão de *L. infantum*, e num aumento da densidade desta espécie. Para *P. ariasi*, estima-se que a sobrevivência diminua nas regiões Centro e Sul do país, e aumente na região Norte. Dado que é sobretudo nesta última região que a importância vectorial de *P. ariasi* se destaca (Pires, 2000), não se espera uma redução nas taxas de transmissão do parasita por este vector. Assim, o risco de transmissão de *L. infantum* em Portugal, actualmente



considerado médio, poderá tornar-se elevado, caso se confirmem as projecções (Casimiro & Calheiros, 2002; Calheiros *et al.*, 2006; Casimiro *et al.*, 2006).

O aumento da temperatura poderá também levar a uma aridização progressiva do território português, favorecendo espécies com preferências bioclimáticas por regiões mais áridas, como é o caso de *P. papatasi* e *P. sergenti*, vectores comprovados de *L. major* e *L. tropica*, respectivamente. Se bem que para *L. major* não se verifique, no território, a presença dos hospedeiros reservatórios (gerbilídeos), foi já isolado de humanos no país, um híbrido de *L. major/L. infantum* (Ravel *et al.* 2006) capaz de desenvolvimento intravectorial em *P. papatasi* (Volf *et al.*, 2007). A leishmaniose cutânea por *L. tropica* é uma antroponose, cujo risco de introdução em Portugal poderá verificar-se com o aumento das densidades, o aumento do período de actividade e/ou da expansão geográfica do vector. Não nos podemos ainda esquecer que o efeito das alterações climáticas é global, e pode fazer-se sentir noutras regiões do globo menos desenvolvidas, levando a migrações em massa de habitantes de países em que estas espécies de *Leishmania* são endémicas, aumentando assim o risco de introdução em Portugal.

## 1.6 - Controlo das leishmanioses

Para o controlo sustentável das leishmanioses numa determinada área endémica, deverá efectuar-se uma luta integrada, com medidas adaptadas e específicas, e baseadas no conhecimento da epidemiologia da doença e da bioecologia das espécies alvo, tanto dos vectores como dos parasitas, reservatórios e hospedeiros acidentais. A monitorização deverá ser desenvolvida antes e durante a luta, contra a parasitose, para avaliar os resultados da mesma.

As medidas passam pelo diagnóstico e tratamento dos casos de infecção dos humanos pois, até à data, não existe uma vacina aprovada para a leishmaniose humana. Em determinadas circunstâncias, deverá utilizar-se a chamada “protecção individual” que inclui o uso de repelentes (ex. DEET - N,N-dietil-meta-toluamida, óleo de citronela e óleo de Neem) e materiais tratados com insecticidas, como vestuário, lençóis, redes mosquiteiras e cortinas, de forma a proteger o ser humano da picada dos flebótomos (Alexander & Maroli, 2003).

Deverá, igualmente, desenvolver-se o controlo dos reservatórios e dos vectores.

No caso da leishmaniose por *L. infantum*, e para controlo do reservatório canino, aconselha-se o uso de coleiras repelentes impregnadas com deltametrina, ou fórmulas “spot-on” baseadas em permetrinas, que reduzem a taxa de picada dos cães pelos vectores ao mesmo tempo que aumentam a taxa de mortalidade dos flebotómíneos que, eventualmente, neles se tentam alimentar (OMS, 2010). O tratamento dos animais infectados deverá ser efectuado, ainda que não fiquem curados, têm uma melhor qualidade de vida e diminui-lhes a parasitémia/carga parasitária com todos os benefícios que daí advém em relação à transmissão. Contudo, é recomendável que estes animais usem as referidas coleiras/formulações para evitar que se mantenham como potenciais reservatórios do parasita. Mais difícil torna-se o controlo dos animais infectados e abandonados, cabendo às instituições locais/regionais tomarem as devidas precauções. De realçar que, no ano de 2011, foi lançada pela primeira vez na Europa, e em Portugal, uma vacina para a leishmaniose canina, a CaniLeish®, esperando-se, com esta medida preventiva, reduzir a taxa de infecção dos cães, pelo menos, nas regiões onde estas estão a ser utilizadas (Virbac, 2011).

### **1.6.1 - Controlo vectorial**

As estratégias do controlo vectorial de flebotómíneos são maioritariamente direccionadas aos imagos devido à dificuldade em localizar os biótopos larvares destes insectos (Feliciangeli, 2004). Os programas devem incluir várias medidas de forma integrada, acompanhadas da educação para a saúde, de forma a garantir uma maior optimização de recursos para além da vigilância entomológica, durante e após a sua implementação.

A gestão ambiental e o controlo químico são os métodos mais comuns utilizados no controlo destes dípteros.

#### Gestão ambiental

O princípio subjacente a este método, é tornar o ambiente impróprio para a sobrevivência e reprodução do vector (Kishore *et al.*, 2006). Em casos extremos, a

eliminação da espécie alvo só foi conseguida por destruição total do habitat, como ocorreu na Ex-União Soviética para controlo de *P. papatasi*, destruindo as tocas do roedor reservatório, ou na Bolívia para espécies de *Lutzomyia* sp. por deflorestação (Killick-Kendrick, 1999). Medidas menos drásticas como a cobertura de fendas nas paredes de casas e abrigos animais, com uma mistura de cal e lama, obtiveram bons resultados no controlo de *P. argentipes* na Índia (Kumar *et al.*, 1995).

Para espécies peridomésticas, a reorganização e limpeza de áreas peridomiciliárias reduz a probabilidade do vector obter criadouros adequados ao seu desenvolvimento larvar (Amóra *et al.*, 2009).

### Controlo químico

A aplicação de insecticidas residuais é sobretudo realizada com pulverizações intradomiciliárias ou em abrigos de animais para controlo de espécies endofílicas que se alimentem em humanos ou animais domésticos. A utilização deste método em áreas em que as habitações humanas estejam dispersas e rodeadas de populações de reservatório, ou em áreas florestais para espécies silváticas, não parece ser eficaz (Amóra *et al.*, 2009).

O uso de insecticidas químicos no controlo de flebótomos, opção tomada frequentemente em regiões endémicas devido à sua eficácia imediata, não é uma medida permanente. Verificou-se durante os anos 50 e 60, do Século XX, uma redução na prevalência da leishmaniose, em algumas regiões, como resultado das campanhas antimaláricas baseadas sobretudo no uso de DDT. Contudo, esta prevalência rapidamente retomou os valores iniciais após a cessação dos programas de controlo. Apesar de seu comprovado efeito negativo sobre o ambiente, e o aparecimento de resistência por parte de algumas espécies, o DDT continua a ser utilizado em regiões mais pobres, devido ao seu baixo custo e elevada eficácia

Actualmente, recomenda-se o uso de piretróides sintéticos, uma alternativa insecticida de menor impacte ambiental (Kishore, 2006).

Em anos recentes, outras medidas têm sido testadas com resultados promissores, como:

- Pulverização da vegetação com uma mistura de solução açucarada (em que os flebótomos se alimentam) com insecticida para eliminação dos adultos (Müller & Schlein, 2011), ou com a bactéria *Bacillus sphaericus*, que ao ser transportada pelas fêmeas para os respectivos criadouros, diminui a sobrevivência das larvas (Robert *et al.*, 1997).
- Aplicação de fármacos orais com “efeito insecticida” (ex: Ivermectina, Imidacloprid e Novaluron) em gado doméstico e roedores selvagens, com efeito tóxico para as fêmeas zoofílicas que neles se alimentam, ou para as larvas que se desenvolvem nas suas fezes. (Mascari *et al.*, 2011; Wasserberg *et al.*, 2011; Poche *et al.*, 2011).
- Uso de barreiras verticais com insecticidas, para espécies com habitats silváticos na periferia de áreas habitacionais (Warburg & Faiman, 2011).
- Uso de feromonas sintéticas para atracção dos flebótomos a locais tratados com insecticida (Bray *et al.*, 2010).

### 1.7 - Monitorização flebotomínica em áreas endémicas

Para se efectuar a monitorização flebotomínica de uma dada região, vários aspectos devem ser considerados:

Devem ser realizadas capturas de flebótomos em diferentes biótopos e localidades, efectuando a respectiva caracterização das várias áreas de amostragem, incluindo as coordenadas geográficas, condições ambientais e climáticas. Os exemplares capturados, de ambos os sexos, devem ser correctamente identificados e vários parâmetros calculados, como a distribuição, abundância relativa, densidade e associações das várias espécies. As suas variações sazonais, hábitos de endofagia ou exofagia, preferências hemáticas e taxas de infecção por *Leishmania* sp., bem como a época de maior risco de transmissão do parasita, devem também ser determinados.

### **1.7.1 - Métodos de captura de flebótomos**

Existem vários métodos de amostragem flebotómica e a escolha do mesmo depende principalmente do objectivo do estudo a realizar e das condições climáticas da área de estudo.

#### **1.7.1.1 - Amostragem de formas imaturas**

A captura de formas imaturas é pouco utilizada, dada a dificuldade em encontrar criadouros na Natureza. Os métodos de amostragem incluem: exame directo, ao estereomicroscópio, de amostras de solo, vegetação ou animais em decomposição, extracção do solo por flutuação ou dissecação progressiva, colheita de amostras de solo e incubação das mesmas até que os imagos eclodam, ou uso de armadilhas de eclosão e papéis adesivos colocados em potenciais criadouros (Killick-Kendrick, 1987; Feliciangeli, 2004).

#### **1.7.1.2 - Amostragem de imagos**

Na maioria dos casos, as capturas incidem sobre os flebótomos adultos e podem envolver procura activa em locais de repouso, captura sobre isco humano ou animal, ou o uso de armadilhas (Lawyer & Perkins, 2000):

##### Procura activa em locais de repouso

Utilizam-se aspiradores manuais ou eléctricos, que podem ser de vários tipos. Estes métodos permitem a captura de exemplares vivos e são muito utilizados quando se pretendem fêmeas alimentadas ou grávidas. Os aspiradores “de boca” são por vezes escolhidos por serem mais silenciosos. Estes, devem conter filtros numa das extremidades para evitar o risco potencial de inalar o insecto, poeiras ou materiais que possam causar irritação ou infecção ao utilizador (Alexander, 2000).

### Captura sobre isco humano ou animal

É um método fiável quando se pretende analisar quais os hospedeiros em que as espécies flebotomínicas se alimentam e as suas taxas de agressividade. A captura sobre isco humano deve ser evitada em áreas endémicas para doenças de transmissão flebotomínica, dado que existe o risco inerente do “isco” contrair a doença no caso de ser picado por uma fêmea infectada (*Leishmania* spp., arbovirus, bartonela).

### Captura com armadilhas

As armadilhas podem ser fundamentalmente de dois tipos, armadilhas de intercepção (papéis adesivos e armadilha de Malaise) ou armadilhas atractivas (armadilhas luminosas, com ou sem fonte de dióxido de carbono, e armadilhas com isco animal como por exemplo armadilha “Disney”).

Nas armadilhas de intersecção, o método mais utilizado é o uso de papéis adesivos impregnados com óleo de rícino, ou outro. Este método, uma vez que amostra aleatoriamente as espécies nos locais onde os papéis são colocados, é geralmente usado para determinar a composição e densidades flebotomínicas específicas de uma área ou região. Tem como inconvenientes os seguintes factores: ser ineficaz em regiões de elevada humidade e precipitação; os roedores ou outros animais podem danificar os papeis; capturar geralmente um pequeno número de exemplares a não ser que as densidades no local de amostragem sejam elevadas; os insectos mortos são muitas vezes danificados quando retirados do papel (Alexander, 2000).

Das armadilhas de atracção, as mais amplamente utilizadas são as armadilhas luminosas do tipo CDC (“Centers for Disease Control and Prevention”) com ou sem adição de uma fonte de dióxido de carbono (Munstermann, 2004). Os insectos, atraídos pela luz, são sugados para uma gaiola pela acção de uma pequena ventoinha. Este tipo de armadilhas tem a vantagem de capturar exemplares vivos e de exigir um menor esforço de captura uma vez que as armadilhas são deixadas durante a noite nos locais a prospectar. Quando apenas equipadas com lâmpada, estas armadilhas tem um efeito atractivo a curta distância que varia de 2 a 6 m consoante as espécies e intensidade luminosa da lâmpada utilizada. A adição de gelo seco, como fonte de dióxido de carbono, aumenta o raio de atracção da armadilha, mas tem a desvantagem de enviesar

as capturas a favor das fêmeas. Dado que se baseia no fototropismo e/ou quimiotropismo de determinadas espécies este método tem a desvantagem de capturar selectivamente algumas espécies flebotómicas em detrimento de outras (Alexander, 2000).

### 1.7.2- Métodos de detecção e identificação de *Leishmania* spp. em flebótomos

O método mais usado na detecção de *Leishmania* sp. em flebótomos é a dissecação, ao esteromicroscópio, do aparelho digestivo da fêmea para pesquisa de formas promastigotas, ao microscópio, seguido de isolamento do parasita e cultura em meio NNN (“Novy-MacNeal-Nicolle”) (Pires, 2000).

Uma vez estabelecida a cultura, a análise da mobilidade electroforética de isoenzimas (“MLEE”) é o método de referência para a identificação das diferentes espécies e estirpes (zimodemes) de *Leishmania* (Pires, 2000; Campino *et al.* 2006). Baseia-se na diferente migração de moléculas com cargas e tamanhos desiguais (devido a diferenças nos genes que as codificam) quando sujeitas a uma corrente eléctrica. Quando o padrão isoenzimático é semelhante para as várias estirpes em estudo, estas são denominadas zimodemes (Bañuls *et al.*, 2007) e o sistema de Montpellier (“MON”), baseado na análise de 15 enzimas é o mais comumente utilizado (Rioux *et al.*, 1990; Kuhls *et al.*, 2008). É uma técnica demorada e laboriosa, que requer grande experiência simultânea de disseções e identificações dos flebótomos, grandes volumes de culturas “*in vitro*” de parasitas, as culturas podem ser contaminadas, principalmente em laboratórios de campanha e que pode não identificar a diversidade genética dos mesmos, dado que substituições nucleotídicas que não modifiquem a composição dos aminoácidos, ou modificações na composição dos aminoácidos que não alterem a mobilidade electroforética, não são detectadas. Uma das vantagens deve-se ao seu carácter codominante, que permite identificar perfis heterozigóticos (Bañuls *et al.*, 2007).

Recentemente, a técnica de biologia molecular, reacção em cadeia da polimerase (“PCR”) tem-se demonstrado eficaz para a detecção de *Leishmania* sp. em vectores (Aransay *et al.*, 2000; Maia *et al.*, 2009). O método baseia-se na amplificação enzimática de sequências de DNA seleccionadas, que são visualizadas por electroforese

em gel. A PCR apresenta elevada sensibilidade e especificidade, sendo por vezes capaz de detectar até um único parasita, mesmo em situações em que existe excesso de DNA de insecto (Rogers *et al.*, 1990; Saraiva, 2010). A PCR; a PCR seguida de “RFLP” (hidrólise do DNA amplificado por endonucleases de restrição) e as sondas de hibridação são os métodos moleculares mais utilizados na detecção e identificação de *Leishmania* sp. em flebótomos (Saraiva, 2010). As sequências alvo localizam-se nos genes ribossómicos (rRNA), nos genes do mini-exão derivado de rRNA ou genes do minicírculo cinetoplastideal (“kDNA”). Estes últimos têm a vantagem de serem altamente repetitivos devido à grande abundância de minicírculos (Barker, 1989; Aransay *et al.*, 2000; Paiva *et al.*, 2006).

### 1.7.3 – Métodos de identificação das preferências hemáticas de flebótomos

A identificação das refeições sanguíneas dos flebótomos reveste-se da maior importância bioecológica e epidemiológica, permitindo não só conhecer os seus hospedeiros preferenciais e padrões de alimentação em condições naturais, mas também fornecer, indirectamente, informações sobre o potencial das espécies como reservatório do parasita (Ferreira, 1945).

Os métodos imunológicos têm sido os mais amplamente utilizados para identificação do sangue ingerido por artrópodes. Estes incluem, por exemplo, a reacção de precipitinas, utilizada desde o início do Século XX (Ferreira & Ferreira, 1944; Ferreira, 1945), a difusão em gel, o teste de aglutinação do látex, e, mais recentemente, a técnica imunoenzimática ELISA, que tem vindo a ser aperfeiçoada ao longo dos anos (Alves-Pires *et al.*, 1992; Blackwell *et al.*, 1995). Permitem a identificação da fonte sanguínea da espécie do hospedeiro mas têm a desvantagem de, além de serem pouco sensíveis e laboriosos, poderem apresentar reacções cruzadas, de ser necessário a produção de anticorpos específicos para as potenciais fontes e de não identificarem hospedeiros inesperados (Haouas *et al.*, 2007; Maleki-Ravasan *et al.*, 2009).

Nos últimos anos, com a introdução de técnicas moleculares de elevada sensibilidade e especificidade como a PCR, as técnicas imunológicas tem vindo a ser substituídas no estudo das preferências alimentares de artrópodes hematófagos (Mukabana *et al.*, 2002). O produto amplificado pode depois ser utilizado para



identificação das espécies por exemplo, PCR- RFLP, análise de heteroduplex, ou sequenciação (Abbasi *et al.*, 2009). Os genes alvo para amplificação incluem genes mitocondriais como o gene citocromo b (Cit b) (Malmqvist *et al.*, 2004; Svobodová *et al.*, 2003) e o gene citocromo c oxidase subunidade I (“COI”) (Alcaide *et al.*, 2009), ou DNA nuclear, como o gene prepronociceptina (“PNOC”) (Haouas *et al.*, 2007).

Tal como nas técnicas imunológicas, as técnicas que se baseiam na amplificação de fragmentos de DNA exigem que, pelo menos, uma pequena porção do sangue ingerido pelo insecto não tenha sido digerido, uma desvantagem que em anos futuros pode vir a ser ultrapassada pelo uso de técnicas de análise de isótopos estáveis (“SIA”), já utilizadas para estudos de redes tróficas, mas ainda raramente usadas em estudos de interacção parasita-hospedeiro (Gómez-Díaz & Figuerola, 2010).

## 1.8 - Objectivos

### Objectivo geral

O principal objectivo deste trabalho foi caracterizar a fauna flebotomínica existente no Concelho de Torres Novas, pertencente ao Distrito de Santarém e onde, até à data, não tinha sido realizado qualquer inquérito entomológico para a presença destes dípteros.

### Objectivos específicos

- Efectuar uma amostragem extensiva das espécies flebotomínicas no Concelho, realizando capturas em todas as freguesias, em diferentes localidades e em diferentes tipos de biótopos;
- Identificar morfologicamente todos os exemplares capturados, de ambos os sexos, com o auxílio de chaves dicotómicas;
- Determinar as densidades e a abundância relativa das várias espécies e sua variação mensal durante o período de amostragem;
- Caracterizar a distribuição geográfica das espécies flebotomínicas no Concelho;

- Determinar as taxas de infecção por *Leishmania* sp. e preferências hemáticas das fêmeas flebotomínicas capturadas, por métodos moleculares, e avaliar qual a época de maior risco para a transmissão do parasita;
- Com base na caracterização dos locais de amostragem, datas de captura e exemplares capturados, caracterizar aspectos bioecológicos dos flebótomos nesta região, e determinar, por métodos estatísticos, os factores de risco para a presença das várias espécies flebotomínicas.

## 2 - Material e Métodos

### 2.1 - Caracterização da área de estudo

O Concelho de Torres Novas situa-se na região centro de Portugal, ficando administrativamente enquadrado no Distrito de Santarém, Região de Lisboa e Vale do Tejo. Apresenta uma área de 279 Km<sup>2</sup> que se dispõe entre os 39°24' e 39°38' de Latitude Norte e os 8°27' e 8°40' de Longitude Oeste. A cidade de Torres Novas, sede de Concelho, tem uma localização central, a 39°27'N e 8°32'O (Simões, 2003).

O referido Concelho é constituído por 17 freguesias (Fig. 12, Quadro 5): Alcorochel (1), Assentis (2), Brogueira (3), Chancelaria (4), Lapas (5) Meia Via (6), Olaia (7), Paço (8), Parceiros de Igreja (9), Pedrógão (10), Riachos (11), Ribeira Branca (12), Salvador (13), Santa Maria (14), Santiago (15), S. Pedro (16) e Zibreira (17) (Município de Torres Novas, 2009).



**Figura 12** - Mapa de Portugal com a localização da área de estudo: Concelho de Torres Novas (39°24' - 39°40'N, 8°27' - 8°40'O). Os números correspondem às freguesias indicadas no texto.

### 2.1.1- Demografia

O Concelho apresenta uma população de 36.925 habitantes. As freguesias mais densamente povoadas correspondem a S. Pedro, Lapas, Riachos, Meia Via, Santiago e Santa Maria. As freguesias de Brogueira, Chancelaria e Pedrógão são as com menor densidade populacional, principalmente devido à presença da Serra de Aire no caso das últimas duas (Município de Torres Novas, 2009, Quadro 5).

**Quadro 5** - Freguesias do Concelho de Torres Novas, respectiva área e densidade populacional  
(adaptado de Município de Torres Novas, 2009).

Freguesia	Área (Km <sup>2</sup> )	Densidade populacional (nº habitantes/Km <sup>2</sup> )
1- Alcorochel	7,4	119
2- Assentis	32,4	98
3- Brogueira	24,7	43
4- Chancelaria	35,0	53
5- Lapas	4,5	455
6- Meia Via	5,2	275
7- Olaia	24,5	78
8- Paço	8,8	84
9- Parceiros de Igreja	13,0	77
10- Pedrogão	39,5	53
11- Riachos	15,2	357
12- Ribeira Branca	8,7	84
13- Salvador	14,0	155
14- Santa Maria	21,6	203
15- Santiago	5,0	224
16- São Pedro	8,9	641
17- Zibreira	10,2	103
TOTAL	279	132

### **2.1.2 - Orografia e Hidrologia**

O Concelho de Torres Novas é limitado a Norte pela Serra de Aire, que se eleva acima da cota dos 600 metros, ao longo da qual se estende um planalto com cerca de 170 metros de altitude. A restante área está compreendida entre os 25 e os 100 metros de altitude.

No sopé da serra nasce o rio Almonda, que atravessa o Concelho até à sua extremidade Sul, onde, logo a seguir, se junta ao rio Tejo (Ferreira, 2004).

### **2.1.3 - Geologia**

Em termos de constituição geológica verifica-se apenas uma unidade individualizada formada por grandes blocos calcários, o Maciço Calcário Estremenho. Todo o restante material presente é mais recente, estando a maior parte da sua superfície ocupada por materiais da Era Terciária, essencialmente arenitos, conglomerados, margas e calcários dolomíticos e margosos, com intercalações de seixos, areias e cascalheiras. Os terrenos mais recentes são aluviões constituídos por areias, cascalheiras e lodos diversos (Simões, 2003).

### **2.1.4 - Clima**

Os dados climáticos apresentados são baseados nas normais climatológicas 1950-1980 da estação meteorológica de Tancos / Base Aérea (Latitude 39°29'N, Longitude 8°26'O, Altitude 83 m), estação localizada a Este de Torres Novas e que, no contexto da rede de estações do Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, melhor representa o clima do Concelho (Simões, 2003; CMDFCI, 2004).

#### **2.1.4.1 - Temperatura**

As temperaturas médias registadas apresentam um valor médio anual de 16°C, com uma amplitude térmica anual moderada (13°C – 14°C). As temperaturas médias mensais mais reduzidas ocorrem em Dezembro e Janeiro (9,1°C – 9,2°C) e as mais elevadas nos meses de Julho e Agosto (22,8°C – 22,9°C), numa variação cíclica em que

o período de aumento da temperatura de Janeiro a Agosto ocorre de modo mais suave do que o arrefecimento posterior até Dezembro. Em relação às máximas e mínimas mensais é possível registar médias mensais superiores a 30°C no Verão e inferiores a 5°C no Inverno (Simões, 2003).

#### 2.1.4.2 - Precipitação e Humidade relativa

No que concerne ao regime pluviométrico, verifica-se uma precipitação média anual de 730 mm em que os maiores valores de precipitação ocorrem de Outubro a Fevereiro com uma média mensal de 95 mm. Julho e Agosto são os meses mais secos com uma média mensal de 8,9 mm (CMDFCI, 2004).

Relativamente à humidade relativa diária, os valores mais elevados ocorrem durante a noite e primeiras horas da manhã, diminuem até às primeiras horas da tarde para voltarem a aumentar à medida que se aproxima a noite. Em termos sazonais, nos meses de Verão verifica-se a ocorrência de dias com ar seco (55-75%) e muito seco (< 55%) e no Inverno a ocorrência de manhãs em que o ar se encontra muito húmido (> 90%) mas em que, no resto do dia, o ar varia entre seco e húmido (CMDFCI, 2004).

#### 2.1.4.3 - Ventos dominantes

As velocidades médias do vento estão compreendidas entre 11,7 Km/h (Sudeste) e 19,7 Km/h (Noroeste) sem que haja uma predominância clara de um rumo específico. Verifica-se, no entanto, que o número médio de observações em que predominam os ventos de Noroeste (geralmente mais frios e secos), é superior ao número de dias em que os ventos de Este são dominantes (25,8% e 14,8%, respectivamente) (CMDFCI, 2004).

#### 2.1.4.4 - Classificação climática

Segundo a classificação de Köppen, uma das mais utilizadas a nível mundial (Peel *et al.*, 2007), o Concelho apresenta um clima temperado mediterrânico (Csa) com

Verões quentes (média mensal do mês mais quente é superior a 22°C) e chuvas no Inverno (CMDFCI, 2004).

Dado que o clima é reconhecido como o factor ambiental que mais fortemente condiciona a vida e a distribuição dos seres vivos na terra e a bioclimatologia é a ciência que lida com o efeito do ambiente físico nos organismos vivos ao longo do tempo (Encyclopaedia Britannica, 2011), optou-se neste trabalho por incluir uma classificação bioclimática da área de estudo.

Para tal, foi utilizado o sistema de classificação de Rivas-Martinez (Rivas-Martinez *et al.*, 1999) que é baseado numa série de índices, construídos principalmente a partir dos valores da temperatura e precipitação e do tipo de vegetação. Segundo os referidos autores, em Portugal são actualmente reconhecidos seis andares bioclimáticos ou termotipos (Fig. 13) encontrando-se o Concelho de Torres Novas no andar mesomediterrânico (Itc = índice de termicidade compensado, entre 210-350).



**Figura 13** - Termotipos na Península Ibérica. A localização do Concelho de Torres Novas encontra-se assinalada no mapa de Portugal (adaptado de Rivas-Martínez *et al.*, 2001).

O “Itc” foi calculado a partir da seguinte fórmula:  $I_{tc} = 10 \times (\text{temperatura média mínima do mês mais frio} + \text{temperatura média máxima do mês mais frio} + \text{temperatura média anual})$  tendo-se obtido o de valor 338. Relativamente ao critério pluviométrico, encontra-se no andar sub-húmido ( $I_o$  = índice ombrotérmico entre 3,6 – 7,0).

Para o cálculo do “ $I_o$ ” utilizou-se o quociente entre a precipitação total anual e a temperatura anual positiva ( $12 \times 16^\circ\text{C}$ ), obtendo-se o valor 3,8. Os dados da temperatura e precipitação foram registados a partir de Simões, 2003.

### 2.1.5 - Coberto vegetal

No Concelho predomina a ocupação agrícola sendo na sua maioria culturas permanentes onde o olival (*Olea europaea*) tem especial destaque. As restantes culturas permanentes englobam os frutos frescos (onde se destaca a figueira, *Ficus carica*), as vinhas (*Vitis* sp), os citrinos (*Citrus* sp.) e os frutos secos. Quanto às culturas temporárias, são os cereais para grão, os prados temporários e as culturas forrageiras as mais representativas.

A área florestal é constituída fundamentalmente pelo pinheiro bravo (*Pinus pinaster*), o eucalipto (*Eucalipto globulus*), o pinheiro manso (*Pinus pinea*), o carvalho português (*Quercus faginea*), o sobreiro (*Quercus suber*) e a azinheira (*Quercus ilex*) (Ferreira, 2004).

Nas zonas de vegetação espontânea e subespontânea é possível encontrar, para além das várias espécies de *Quercus* já referidas, a silva (*Rubus* sp), a urze (*Erica arborea*), o lentisco (*Pistacia lentiscus*), o medronheiro (*Arbutus unedo*), a esteva (*Cistus ladanifer*), o tojo (*Ulex* sp), a giesta (*Cytisus striatus*), o castanheiro (*Castanea sativa*), a carqueja (*Baccharis trimera*), o zimbro (*Juniperus communis*) e, na proximidade de linhas de água, o freixo (*Fraxinus angustifolia*), o salgueiro (*Salix* sp), o choupo (*Populus* sp.) e o sabugueiro (*Sambucus* sp.) (Simões, 2003).

Existem também grandes áreas de terrenos incultos onde dominam as gramíneas (Família Poaceae).

### 2.1.6 - Fauna

A fauna selvagem inclui uma variedade de anfíbios (rãs, sapos e salamandras), pequenos répteis (lagartos, sardões, osgas e cobras), aves de rapina (mochos, corujas, gaviões, águias, falcões, açores, e milhafres), outras aves (andorinhas, pombos, rolas, melros, pardais, perdizes, corvos, gaios e outros) e mamíferos (ouriços, musaranhos,



toupeiras, morcegos, roedores, raposas, coelhos, lebres, javalis, doninhas, genetas, gatos bravos e texugos) (Simões, 2003).

## **2.2 - Captura de flebótomos**

### **2.2.1 - Período de prospecção, método de captura e conservação do material**

O período de prospecção decorreu de 12 de Junho a 21 de Novembro de 2010. No total, efectuaram-se 73 dias de captura de flebótomos (8 dias em Junho, 18 em Julho, 19 em Agosto, 18 em Setembro, 6 em Outubro e 4 em Novembro) com uma média de 12 dias de captura por mês.

Para as capturas, e dado que se pretendia obter exemplares em bom estado de conservação não só para identificação das espécies mas também para posterior análise molecular, foram utilizadas armadilhas luminosas miniaturizadas do tipo CDC modificadas (*Hausherr's Machine Works, Old Freehold Road, Toms River, NJ 08753, USA* - Fig. 14, cedidas pelo Doutor Carlos Alves Pires, UPMM, IHMT, UNL).

As referidas armadilhas são compostas por uma estrutura metálica onde se insere um sistema eléctrico ligado a uma fonte luminosa (lâmpada de 6V e 60mA) para atrair os insectos que apresentam fototropismo positivo, como é o caso dos flebótomos, e uma ventoinha que os aspira para uma gaiola de rede de Nylon de malha fina, com 18cm de aresta, fixa à armação metálica. Na zona lateral da estrutura existe um suporte onde se colocam as pilhas (descartáveis ou recarregáveis) que permitem o funcionamento consecutivo por mais de 24 horas e, entre a ventoinha e a gaiola de Nylon, para evitar a passagem de insectos de maiores dimensões, existe uma rede metálica de malha quadrada de 1cm<sup>2</sup> (Pires, 2000). Para as pilhas recarregáveis utilizaram-se carregadores Duracell® Accu Recharger.



**Figura 14** - Armadilha luminosa miniaturizada do tipo CDC modificada e respectiva gaiola (fotografia de Sofia Branco, 2010).

As armadilhas CDC são eficazes na atracção de flebótomos num raio de dois metros (Killick-Kendrick *et al.*, 1985) e devem ser colocadas no máximo a 1,5 metros do solo (Rioux *et al.*, 1971). As armadilhas foram colocadas ao final da tarde e recolhidas entre as seis e as oito horas da manhã seguinte.

Para transporte dos insectos capturados, desde o local de captura até ao local de processamento do material, foram utilizadas caixas isotérmicas, com acumuladores a  $-4^{\circ}\text{C}$ , mantendo-se assim os flebótomos vivos mas menos activos e posteriormente, foram mortos pelo frio a  $-20^{\circ}\text{C}$ . De imediato, eram aspirados com um aspirador manual (*Hausherr's Machine Works*) e transferidos para tubos de plástico com álcool a 90%, devidamente etiquetados (número do biótopo). As amostras em álcool foram mantidas à temperatura ambiente (cerca de  $25^{\circ}\text{C}$ ) até posterior processamento laboratorial.

### 2.2.2 - Método de amostragem

Para se obter uma amostra representativa das espécies flebotomínicas do Concelho optou-se por uma amostragem proporcional estratificada, em que o número de

biótopos amostrados, por freguesia, foi aproximadamente proporcional à área (em Km<sup>2</sup>) da respectiva freguesia.

Previamente ao início das capturas foram distribuídos, pelas clínicas veterinárias e pequenos cafés das aldeias, folhetos informativos do estudo a realizar (anexo 1), na tentativa de se obter a participação do maior número de residentes locais. Dado que o número de inscritos para contacto foi reduzido (10/50 folhetos distribuídos), os folhetos foram então entregues directamente aos habitantes nos dias de captura e solicitou-se autorização para colocação das armadilhas CDC nas suas propriedades.

Antes de se efectuarem as primeiras capturas, elaborou-se um modelo de ficha de campo, apropriado à região, e em que se anotava por biótopo, todos os elementos pretendidos (ponto 2.2.3.2), (anexo 2).

### **2.2.3 - Biótopos prospectados**

#### **2.2.3.1 - Divisão e caracterização dos vários tipos de biótopos**

Caracterizaram-se todas as zonas de captura num raio de dois metros da colocação da armadilha luminosa CDC, dado que esta é a distância a que os flebótomos são teoricamente atraídos pela mesma. Os vários tipos de biótopos amostrados foram agrupados em três grandes grupos, nomeadamente biótopos domésticos, peridomésticos e silváticos:

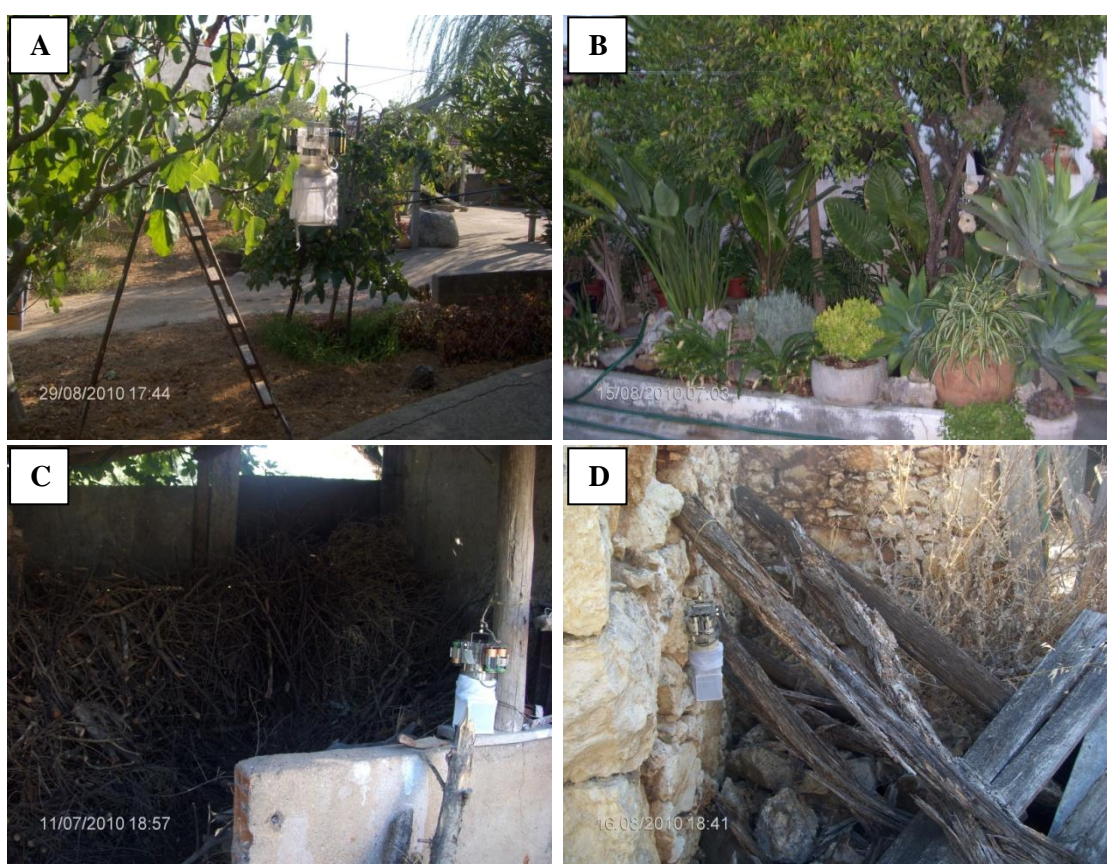
##### **- Biótopos domésticos**

Enquadrou-se neste grupo todos os biótopos na contiguidade de habitações humanas, excluindo-se os utilizados especificamente para o resguardo de animais. Os biótopos domésticos foram ainda subdivididos de acordo com a presença ou ausência de animais de companhia, nomeadamente cães e/ou gatos, de livre circulação pelo biótopo amostrado.

Categorias de biótopos domésticos:

- Casa quintal: zona contígua à habitação, geralmente pavimentada, com pouca ou nenhuma vegetação ornamental, podendo existir cultivo de algumas espécies vegetais para consumo (Fig. 15 - A).

- Casa jardim: zona contígua à habitação predominando plantas ornamentais (Fig. 15 - B).
- Casa armazém de lenha: área coberta, próxima da habitação, utilizada para resguardo de lenha (Fig. 15 - C).
- Casa garagem: área coberta, próxima da habitação, utilizada para resguardo de veículos automóveis.
- Casa abandonada: habitação desabitada e degradada (Fig. 15 - D).



**Figura 15** - Exemplos de biótopos domésticos: A - Casa quintal (biótopo 160), B - Casa jardim (biótopo 105), C - Casa armazém de lenha (biótopo 43), D - Casa abandonada (biótopo 114) (fotografias de Sofia Branco, 2010).

#### - Biótopos peridomésticos

Neste grupo incluíram-se todos os abrigos de animais domésticos e o tipo de biótopo foi definido de acordo com a espécie animal presente (Fig. 16). No caso de



abrigo albergando mais do que uma espécie, ou quando a armadilha CDC foi colocada num espaço intermédio (a menos de dois metros), entre abrigos de espécies diferentes, estes foram considerados abrigos mistos.



**Figura 16** - Exemplos de biótopos peridomésticos: A - Canil (biótopo 116), B - Curral de ovelhas (biótopo 168), C - Capoeira (biótopo 77), D - Misto, coelheira, pombal, canil (biótopo 77) (fotografias de Sofia Branco, 2010).

#### - Biótopos silváticos

Consideraram-se silváticos todos os biótopos situados a uma distância mínima de trezentos metros de habitações ou abrigos animais e incluíram-se os seguintes tipos (Fig. 17):

- Buraco em rocha.
- Canavial.
- Mato (zona com vegetação espontânea ou subespontânea).

- Poço (em área agrícola).



**Figura 17** - Exemplos de biótopos silváticos: A - Buraco em rochas (biótopo 110), B - Mato (biótopo 204) (fotografias de Sofia Branco, 2010).

### 2.2.3.2 - Registos dos biótopos

Para cada biótopo, foram registados na ficha de campo os dados referentes ao biótopo em questão (raio de aproximadamente 30 metros a partir da armadilha CDC). Assim, foram registados:

- O número do biótopo e sua localização geográfica, incluindo localidade e coordenadas - latitude, longitude e altitude registadas com um GPS portátil (N-Drive® G800, software Navigon).
- O tipo de biótopo, tipo de solo e vegetação dominante.
- As espécies e o número de animais presentes no local.
- A hora de colocação da armadilha CDC, a hora de recolha e a duração da captura.
- A temperatura e a humidade relativa existentes no biótopo à hora de colocação da armadilha CDC e à hora de recolha da mesma, medidas com um termo-higrómetro digital portátil (TFA, Dual).
- O nível aparente de vento no local prospectado na altura de colocação da armadilha CDC, numa escala de zero a dois, em que o zero corresponde à ausência de vento e o dois a vento forte.

- O nível de exposição do biótopo às condições ambientais do local, numa escala de zero a cinco, em que o zero corresponde a exposição total, ou seja a ausência de qualquer superfície protectora, e o cinco a uma zona coberta e totalmente delimitada por paredes ou outras superfícies protectoras.

No caso da presença de cães no local, efectuaram-se as seguintes questões aos proprietários:

- Utilização, ou não, de substâncias repelentes (como o Advantix® ou coleiras Scalibor®) para protecção dos animais.

- Se a algum dos cães tinha sido diagnosticada leishmaniose por um médico veterinário.

- Em caso positivo, se o animal se encontrava em tratamento.

Para cada biótopo foi ainda efectuado o registo fotográfico com uma câmara digital (HP® Photosmart R840).

### **2.3 - Identificação morfológica dos flebótomos capturados**

A lista do material utilizado para identificação dos imágos encontra-se no anexo 3.

A separação dos flebótomos, por sexo e de outros artrópodes capturados, foi efectuada ao estereomicroscópio, a uma ampliação de 12x.

Os exemplares conservados em álcool a 90%, e por biótopo, foram transferidos para placas de Petri e, após observação, os machos e as fêmeas foram colocados separadamente em tubos de plástico, igualmente em álcool a 90%, e devidamente etiquetados (número do biótopo, macho ou fêmea).

#### **2.3.1 - Identificação dos flebótomos machos**

A identificação dos flebótomos machos, fundamentalmente baseada nas características das genitálias, foi realizada em duas fases:

a) - Identificação ao estereomicroscópio:

- Os exemplares, de cada biótopo, foram transferidos com uma pipeta de plástico, do tubo de plástico correspondente, para uma placa de Petri, contendo álcool a 90% e, posteriormente, e individualmente, para um godé de vidro contendo igualmente álcool 90%.

- Foram observados ao estereomicroscópio com uma ampliação de 56x e identificados morfológicamente recorrendo a uma chave dicotómica para as espécies flebotómicas assinaladas em Portugal (Pires, 2000).

- Foram anotadas as espécies, de cada biótopo, num “caderno de laboratório”, separados por espécies, contados e novamente colocados nos tubos, com álcool a 90%, devidamente etiquetados.

**b) - Identificação ao microscópio óptico:**

- Dos exemplares anteriormente identificados (**a**), e de forma a melhor observar alguns aspectos muito específicos, 20 exemplares de *P. perniciosus*, 10 de *P. ariasi*, 10 de *P. sergenti* e 10 de *S. minuta*, escolhidos aleatoriamente, foram montados entre lâmina e microlamela, em meio de Hoyer, mantidos na estufa a 32°C, durante 60 dias, e observados ao microscópio óptico com uma ampliação de 125x e 312,5x.

- A identificação, nesta fase, foi realizada através de uma chave dicotómica, efectuada e adaptada, tendo em vista as espécies não só assinaladas em Portugal mas também em Espanha e Marrocos (ponto 2.3.3.1).

### **2.3.2 - Identificação dos flebótomos fêmeas**

Para identificação das fêmeas utilizou-se uma chave dicotómica efectuada para as espécies assinaladas em Portugal, Espanha e Marrocos (ponto 2.3.3.2), baseada fundamentalmente na morfologia das espermatecas, e de acordo com o seguinte protocolo:

- Retiravam-se as fêmeas de um determinado tubo de plástico (correspondente a um determinado biótopo), com uma pipeta de plástico, para uma placa de Petri contendo igualmente álcool a 90%.

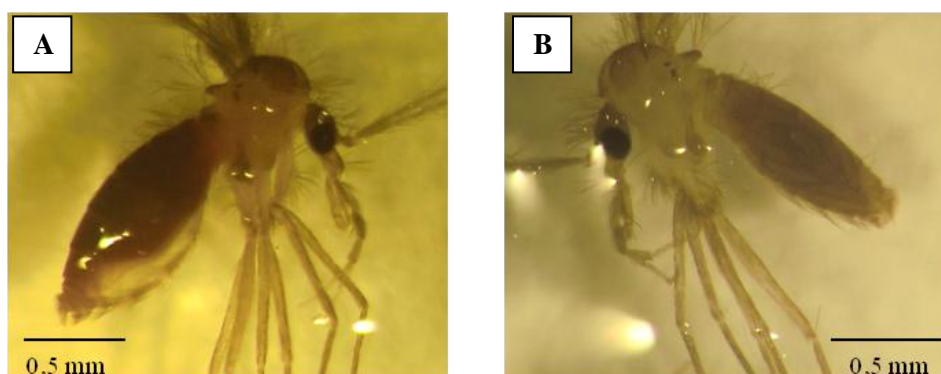


- Com uma pinça entomológica colocava-se cada fêmea, em posição lateral, no centro de uma lâmina de vidro na extremidade da qual se punha previamente uma gota de soluto de Marc-André (com uma vareta de vidro).

- Com duas agulhas de dissecação, e ao estereomicroscópio, fazia-se um corte transversal nos dois a três últimos segmentos abdominais, que eram transferidos para a gota de soluto Marc-André e cobertos com uma microlamela.

- O restante corpo da fêmea (cabeça, tórax e abdómen, menos os últimos segmentos abdominais - genitália) era colocado num tubo Eppendorf, contendo 200 µl de tampão de lise, devidamente identificado e registado, e conservado a -20°C para posterior análise molecular.

- Registava-se, igualmente, se a fêmea se encontrava alimentada (sangue visível no abdómen, Fig. 18 - A), não alimentada, grávida (ovos visíveis no abdómen, Fig. 18 - B), se havia malformações nas espermatecas, se estavam presentes ectoparasitas (ácaros) e/ou endoparasitas (nemátodes e *Adelina* sp).



**Figura 18** - Fêmeas de flebótomo: A - alimentada, B - grávida  
(fotografias de Sofia Branco, exemplares de Torres Novas, 2010).

- Após dois a três minutos, tempo necessário para que o soluto de Marc-André esclarecesse os últimos segmentos do abdómen e permitisse a observação das diferentes estruturas das espermatecas, observava-se a lâmina ao microscópio, com ampliações de 125x, 312x e 500x, e procedia-se à identificação morfológica da espécie flebotomínica (ponto 2.3.3.2) (registo também efectuado).

- Repetia-se este procedimento para cada uma das fêmeas capturadas, sendo necessário esterilizar as agulhas e as pinças, à chama da lamparina, entre cada dissecação e montagem, de forma a evitar contaminações no caso de algum dos exemplares se encontrar infectado com *Leishmania* sp.

### 2.3.3 - Chave dicotómica de identificação dos flebotomos

Devido à possibilidade de espécies actualmente não assinaladas em Portugal poderem vir a ser introduzidas, ou detectadas no país, foram efectuadas duas chaves entomológicas (para machos e para fêmeas) em que para além das espécies actualmente assinaladas em Portugal, foram incluídas as espécies do género *Phlebotomus* assinaladas em Espanha e Marrocos até à presente data (Quadro 6). Considerou-se que sendo estas espécies características dos países da Bacia Mediterrânica e geograficamente mais próximos de Portugal, seria eventualmente provável a sua presença, ou, futuramente, poder haver a hipótese de uma introdução no país.

As chaves dicotómicas, para flebotomos machos e fêmeas, foram efectuadas e adaptadas a partir dos trabalhos realizados por: Benabdenni *et al.*, 1999; Chamkhy *et al.*, 2006; Léger *et al.*, 1983; Lewis, 1982; Depaquit *et al.*, 1998b; Ghrab *et al.*, 2005; Kakarsulemankhel, 2009, 2010; Pires, 1979, 2000.

**Quadro 6** - Espécies flebotomínicas do Género *Phlebotomus* actualmente assinaladas em Portugal, Espanha e Marrocos e sua restante distribuição geográfica. Distribuição de *S. minuta* (adaptado de WRBU, 2011, Seccombe *et al.*, 1993, Depaquit *et al.*, 1998a e de Beran, 2010).

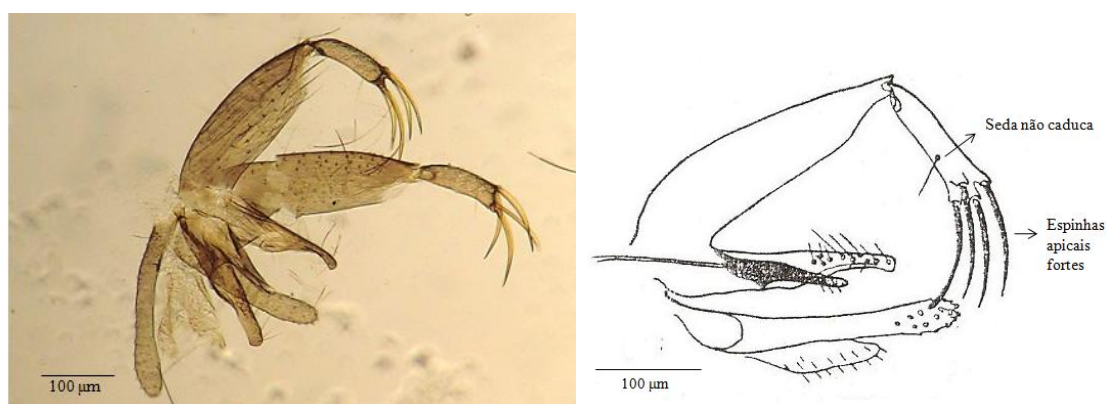
Espécies flebotomínicas	Distribuição conhecida
<b>Género <i>Phlebotomus</i></b>	
<b>Subgénero <i>Larroussius</i>:</b>	
<i>Phlebotomus (Larroussius) ariasi</i>	<b><u>Portugal</u>, Espanha e Marrocos;</b> Argélia, França, Itália e Tunísia.
<i>Phlebotomus (Larroussius) chadlii</i>	<b>Marrocos;</b> Argélia e Tunísia.
<i>Phlebotomus (Larroussius) langeroni</i>	<b>Espanha e Marrocos;</b> Argélia, Egipto e Tunísia.
<i>Phlebotomus (Larroussius) longicuspis</i>	<b>Espanha e Marrocos;</b> Argélia, Líbia e Tunísia.
<i>Phlebotomus (Larroussius) mariae*</i>	<b>Marrocos.</b>

<i>Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi</i>	<b>Marrocos;</b> Argélia, Albânia, Croácia, Grécia, Hungria, Itália, Malta, Roménia, Sérvia, Tunísia, Turquia e Ucrânia.
<i>Phlebotomus (Larroussius) perniciosus</i>	<b>Portugal, Espanha e Marrocos;</b> Alemanha, França, Itália, Malta, Suíça, Argélia, Líbia e Tunísia.
<b>Subgénero <i>Paraphlebotomus</i></b>	
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri</i>	<b>Espanha e Marrocos;</b> Afeganistão, Argélia, Arábia Saudita, Azerbaijão, China, Chipre, Djibuti, Egito, Etiópia, Grécia, Iémen, Índia, Iraque, Israel, Jordânia, Cazaquistão, Kuwait, Mongólia, Paquistão, Roménia, Sudão, Turquemenistão, Tunísia e Turquia.
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi</i>	<b>Espanha e Marrocos;</b> Argélia Líbia e Tunísia.
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi</i>	<b>Espanha e Marrocos;</b> Tunísia.
<i>Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti</i>	<b>Portugal, Espanha e Marrocos</b> Afeganistão, Argélia, Arábia Saudita, Ilhas Canárias, <b>Ilha da Madeira</b> , Canárias, Chipre, República Checa, Egito, Eslovénia, Etiópia, França, Grécia, Iémen, Índia, Irão, Iraque, Israel, Itália, Jordânia, Cazaquistão, Líbano, Líbia, Mali, Malta, Nepal, Nigéria, Paquistão, Roménia, Síria, Tunísia e Turquia.
<b>Subgénero <i>Phlebotomus</i></b>	
<i>Phlebotomus (Phlebotomus) bergeroti</i>	<b>Marrocos;</b> Argélia, Arábia Saudita, Djibuti, Egito, Emiratos Árabes Unidos, Etiópia, Iémen, Irão, Israel, Jordânia, Mauritânia, Somália e Sudão.
<i>Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi</i>	<b>Portugal, Espanha e Marrocos;</b> Afeganistão, Argélia, Arábia Saudita, Arménia, Azerbaijão, Bangladesh, Bulgária, Chipre, Egito, Etiópia, França, Geórgia, Grécia, Hungria, Cazaquistão, Iémen, Índia, Irão, Iraque, Israel, Itália, Jordânia, Jugoslávia Kuwait, Líbano, Líbia, Malta, Nepal, Nigéria, Oman, Paquistão, Roménia, Sri-Lanka, Sudão, Síria, Tunísia, Turquemenistão e Uzbequistão.
<b>Subgénero <i>Transphlebotomus</i></b>	
<i>Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii</i>	<b>Espanha;</b> Alemanha, Argélia, Bélgica, Chipre, Croácia, França, Israel, Itália, Grécia, Jordânia, Jugoslávia, Líbano, Síria, Suíça e Turquia.
<b>Género <i>Sergentomya</i></b>	
<i>Sergentomya (Sergentomya) minuta</i>	<b>Portugal, Espanha e Marrocos;</b> Albânia, Argélia, Bósnia, Ilhas Canárias, <b>Ilhas Selvagens-Madeira</b> , Croácia, Chipre, França, Grécia, Itália, Líbia, Malta, Macedónia, Montenegro, Roménia, Sérvia, Síria, Suíça, Ucrânia e Tunísia.

\*Apenas o macho se encontra descrito

2.3.3.1 - Chave de Identificação para espécies flebotomínicas (Diptera, Psychodidae) do Género *Phlebotomus* e de *S. minuta* de Portugal, Espanha e Marrocos - Machos

- 1 - Asa com  $\alpha < \beta$ ; gonostilo com 4 espinhas apicais fortes e uma seda não caduca (Subgénero *Sergentomya*) (Fig. 19) ..... ***Sergentomya (Sergentomya) minuta***
- Asa com  $\alpha > \beta$ ; gonostilo com 4 ou 5 espinhas inseridas a diferentes níveis (Género *Phlebotomus*) ..... **2**

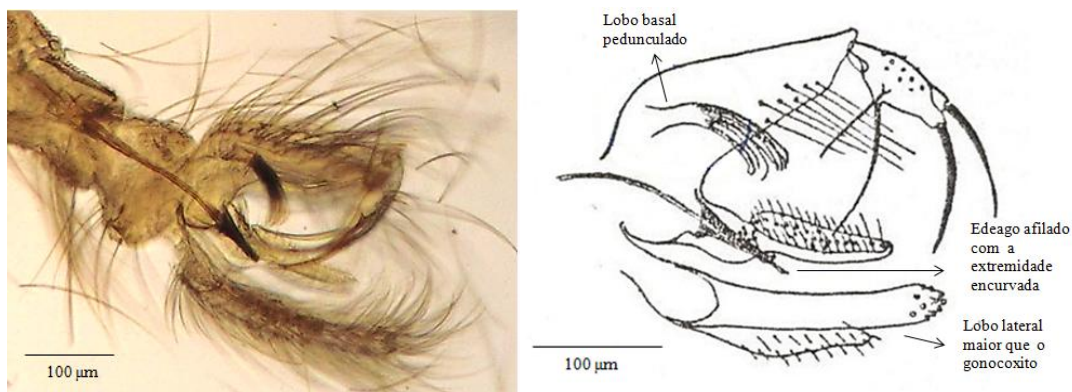


**Figura 19** - Genitália de *S. minuta* macho (fotografia de Sofia Branco, exemplar de Torres Novas, 2010, observado por microscopia óptica e esquema adaptado de Theodor, 1948).

- 2 - Gonostilo com 4 espinhas; gonocoxito com lobo basal pedunculado (Subgénero *Paraphlebotomus*) ..... **3**
- Gonostilo com 5 espinhas; gonocoxito desprovido de lobo basal pedunculado..... **6**
- 3 - Lobo lateral mais pequeno que o gonocoxito; edeago afilando-se suavemente para a extremidade, mas com esta dilatada ..... ***Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri*\***
- Lobo lateral maior que o gonocoxito; edeago afilado..... **4**
- 4 - Edeago afilado com o ápex encurvado e quitinizado (Fig 20) ..... ***Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti***

\* Espécie não assinalada em Portugal

- Edeago afilado em forma de lâmina de punhal, ápex não encurvado e com a extremidade distal transparente..... 5



**Figura 20** - Genitália de *P. sergenti* macho (fotografia de Sofia Branco, exemplar de Torres Novas, 2010, observado por microscopia óptica e esquema adaptado de Theodor, 1948).

- 5** - Edeago com ápex em ponta, geralmente em forma de bisel; 34 (23-40) sedas no lobo basal pedunculado..... *Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi*\*

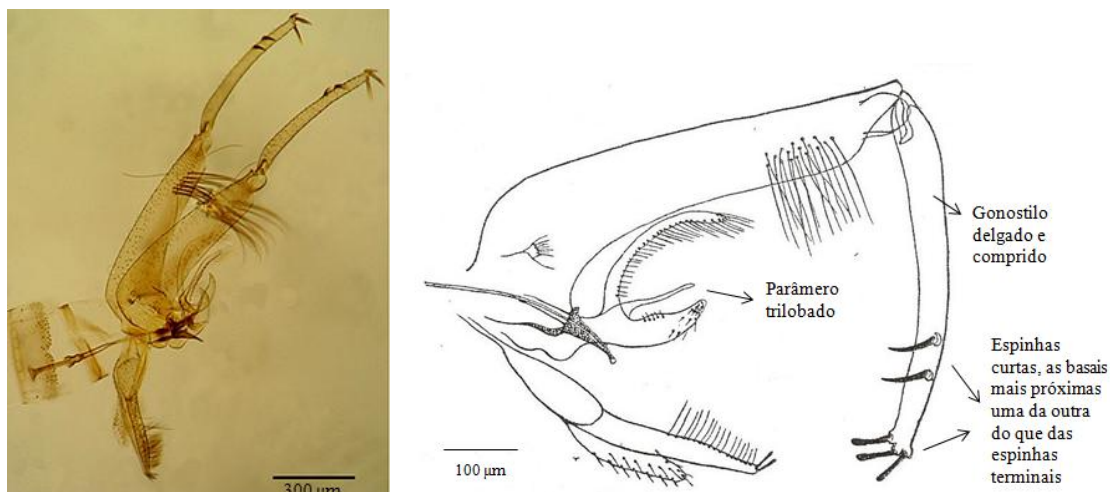
- Edeago com ápex pontiagudo, com afilamento progressivo, não em forma de bisel; cerca de 10 sedas no lobo basal pedunculado.....  
..... *Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi*\*

- 6** - Gonostilo delgado e comprido, maior ou igual ao gonocoxito, com espinhas curtas; parâmero trilobado (Subgénero *Phlebotomus*) ..... 7

- Gonostilo curto e largo com espinhas longas; parâmeros simples ..... 8

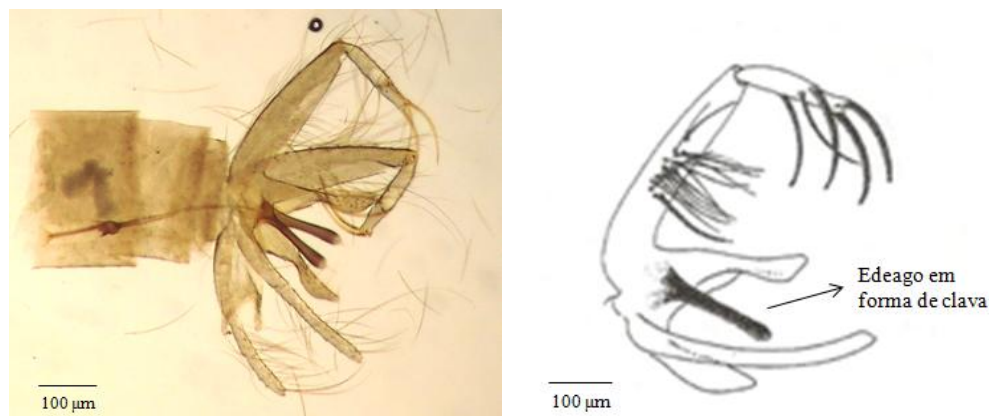
- 7** - Gonocoxito e gonostilo relativamente curtos, uma das espinhas basais muito mais próxima das espinhas terminais do que da outra espinha basal ..... *Phlebotomus (Phlebotomus) bergeroti*\*

- Gonocoxito e gonostilo longos, espinhas basais mais próximas uma da outra do que das espinhas terminais (Fig. 21) ..... *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi*



**Figura 21** - Genitália de *P. papatasi* macho (fotografia adaptada de Dantas-Torres *et al.*, 2010 e esquema adaptado de Theodor, 1948).

- 8** - Edeago com processo distal transparente ligeiramente encurvado e suportando finos dentes dorsais ..... *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi*\*
- Edeago sem processo distal transparente ..... **9**
- 9** - Edeago arredondado no ápex ..... **10**
- Edeago afilado no ápex ..... **13**
- 10** - Edeago com marcada dilatação sub-apical ..... **11**
- Edeago sem dilatação sub-apical ou dilatação muito ténue ..... **12**
- 11** - Edeago em forma de espada, com espessa dilatação sub-apical e ápex aproximadamente em bico; 37-78 sedas na face interior do gonocoxito ..... *Phlebotomus (Larroussius) chadlii*\*
- Edeago em forma de clava, com dilatação sub-apical moderada; 16- 32 sedas na face interior do gonocoxito (Fig. 22) ..... *Phlebotomus (Larroussius) ariasi*



**Figura 22** - Genitália de *P. ariasi* macho (fotografia de Sofia Branco, exemplar de Torres Novas, 2010, observado por microscopia óptica e esquema adaptado de Pires, 2000).

- 12** - Edeago estreitando-se regularmente até ao ápex .....  
..... *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii*\*  
- Edeago com ténue dilatação sub-apical ..... *Phlebotomus (Larroussius) mariae*\*
- 13** - Edeago longo, com o ápex truncado, em forma de bisel .....  
..... *Phlebotomus (Larroussius) langeroni*\*  
- Edeago sem estas características ..... **14**
- 14** - Edeago com o ápex simples e ligeiramente curvado; 15-31 sedas na face interior do gonocoxito ..... *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis*\*  
- Edeago com ápex bífido, ou simples e acentuadamente curvado; 8-17 sedas na face interior do gonocoxito (Fig. 23)..... *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus*



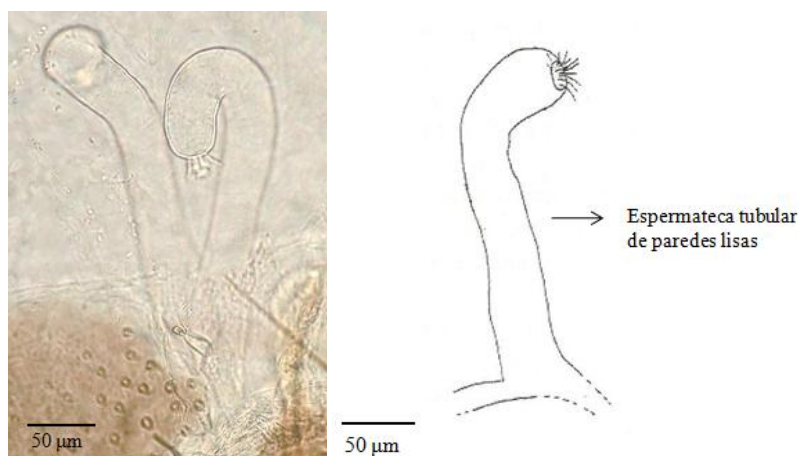
**Figura 23** - Genitália de *P. perniciosus* macho (fotografia de Sofia Branco, exemplar de Torres Novas, 2010, observado por microscopia óptica e esquema adaptado de Pires, 2000).

#### 2.3.3.2 - Chave de Identificação para espécies flebotomínicas (Diptera, Psychodidae) do Género *Phlebotomus* e de *S. minuta* de Portugal, Espanha e Marrocos - Fêmeas

**1** - Asa com  $\alpha < \beta$  ; cibário com uma fiada transversal de 40-70 dentes e uma mancha quitinizada a meio; espermateca tubular de paredes lisas (Fig. 24)  
 ..... *Sergentomya (Sergentomya) minuta*

- Asa com  $\alpha > \beta$ ; cibário inerte ou somente com pequenos dentículos dispersos e dificilmente visíveis; espermateca segmentada ou incompletamente segmentada, com longos ductos (Génro *Phlebotomus*)..... **2**



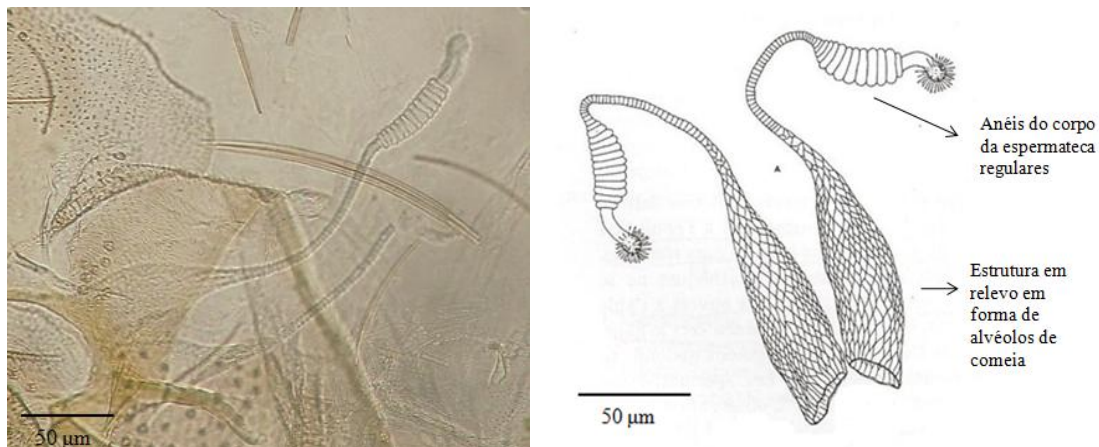


**Figura 24** - Espermateca de *S. minuta* (fotografia de Sofia Branco, exemplar de Torres Novas, 2010, observado por microscopia óptica e esquema adaptado de Pires, 2000).

- 2 - Espermateca tubular com o corpo revestido de estrias onduladas; canal condutor dilatado na extremidade distal ..... *Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii*\*
- Espermateca com o corpo anelado; canal condutor não dilatado na extremidade distal ..... 3
- 3 - Espermateca com o colo longo e estreito (Subgénero *Larroussius*) ..... 4
- Espermateca desprovida de colo ..... 9
- 4 - Canal condutor de espermateca alargando-se para além da metade basal ..... 5
- Canal condutor de espermateca de diâmetro uniforme e estriado, com um bolbo na região basal..... 7
- 5 - Dilatação do canal condutor da espermateca delimitado por um espessamento das paredes em forma de prega..... *Phlebotomus (Larroussius) langeroni*\*
- Dilatação do canal condutor da espermateca sem estas características ..... 6

**6** - Anéis do corpo da espermateca regulares; canais condutores estriados, com a zona dilatada da metade basal apresentando uma parede com estrutura em relevo, em forma de alvéolos de colmeia (Fig. 25) ..... *Phlebotomus (Larroussius) ariasi*

- Corpo da espermateca com o 1º e últimos anéis mais largos que os restantes; canais condutores lisos em toda a sua extensão ..... *Phlebotomus (Larroussius) chadlii*\*



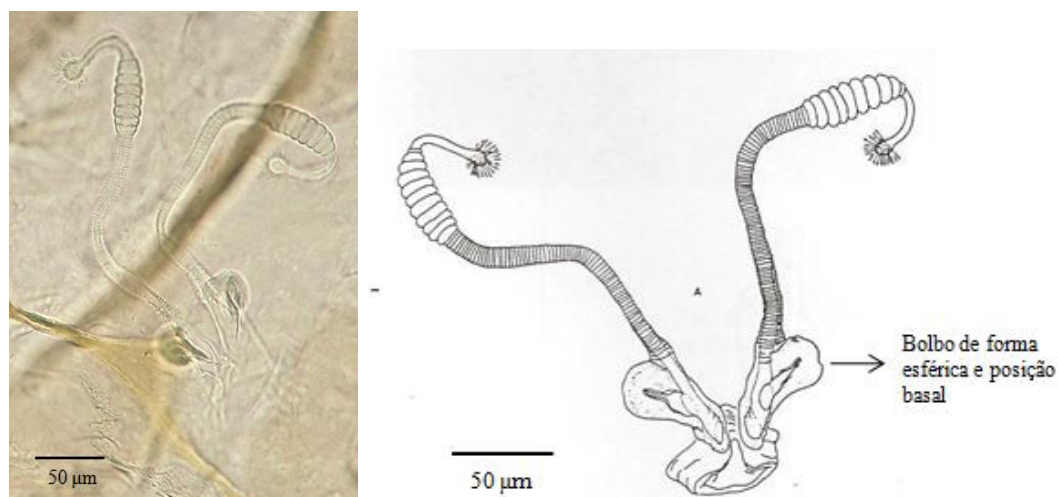
**Figura 25** - Espermateca de *P. ariasi* (fotografia de Sofia Branco, exemplar de Torres Novas, 2010, observado por microscopia óptica e esquema adaptado de Léger *et al.*, 1983).

**7** - Corpo da espermateca com 10 anéis (8-12) ..... **8**

- Corpo da espermateca com 15 anéis (12-16); canal condutor com bolbo na região basal, de grandes dimensões e assimétrico ..... *Phlebotomus (Larroussius) perfiliewi*\*

**8** - Bolbo no canal condutor da espermateca de forma aproximadamente esférica e posição basal (Fig. 26) ..... *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus*

- Bolbo no canal condutor da espermateca ligeiramente bilobado, em forma de coração e posição sub-basal ..... *Phlebotomus (Larroussius) longicuspis*\*



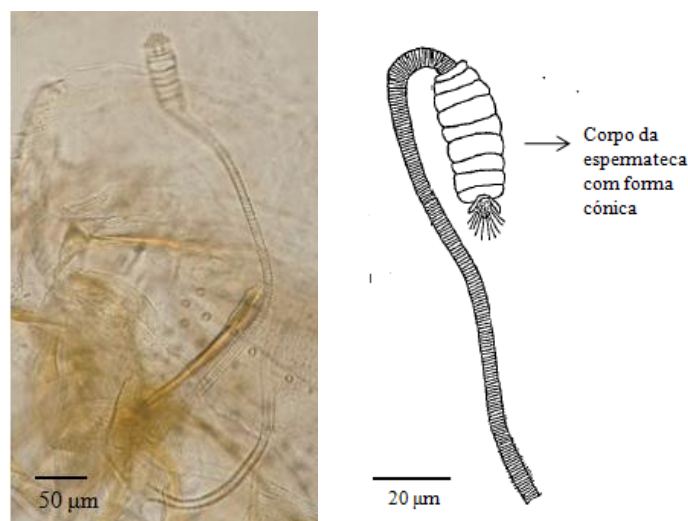
**Figura 26** - Espermateca de *P. perniciosus* (fotografia de Sofia Branco, exemplar de Torres Novas, 2010, observado por microscopia óptica e esquema adaptado de Léger *et al.*, 1983).

**9** - Faringe com escamas finamente dentadas ou uma rede de linhas; corpo da espermateca com anéis aproximadamente iguais e uma membrana refractiva perto do anel distal (Subgénero *Phlebotomus*) ..... **10**

- Faringe com largos dentes virados para trás (Subgénero *Paraphlebotomus*); corpo da espermateca com, no máximo, 9 anéis desiguais..... **11**

**10** - Corpo da espermateca com forma cilíndrica, aproximadamente igual anteriormente e posteriormente; faringe com dentes escamosos dispostos obliquamente e direccionados para trás ..... *Phlebotomus (Phlebotomus) bergeroti*\*

- Corpo da espermateca com forma cónica, longo, com cerca de 10 anéis, acentuada diminuição de largura posteriormente (Fig. 27); faringe com dentes escamosos não direccionados para trás)..... *Phlebotomus (Phlebotomus) papatasi*



**Figura 27** - Espermateca de *P. papatasi* (fotografia de Sofia Branco, exemplar de Algarve, 2010, observado por microscopia óptica e esquema adaptado de Abbonenc, 1972).

**11**- Faringe com os dentes dispostos numa malha cerrada, mais alta que larga; corpo da espermateca com o anel distal campanulado, alargado no ápex e invaginando-se à volta da cabeça ..... **12**

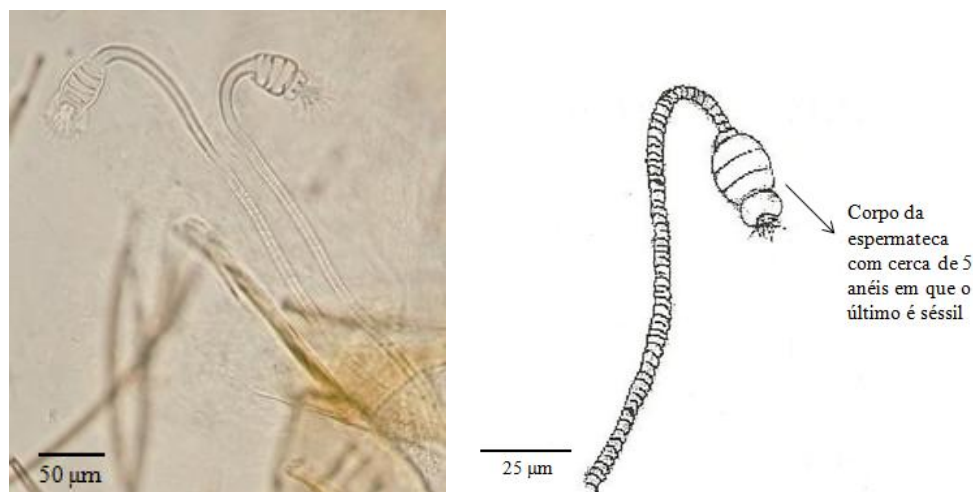
- Faringe com os dentes dispostos numa malha cerrada, mais larga que alta; corpo da espermateca com o anel distal diferente ..... **13**

**12** - Armadura do átrio genital com espinhas longas, em grupos de 2 a 4 (aspecto espesso), ocupando quase a totalidade da superfície do átrio genital ..... *Phlebotomus (Paraphlebotomus) riouxi*\*

- Armadura do átrio genital constituídas por pequenas espinhas finas, escassas, e dispostas dentro de um rectângulo ligeiramente arqueado, duas vezes mais largo que alto ..... *Phlebotomus (Paraphlebotomus) chabaudi*\*

**13** - Faringe com as malhas espessas e rígidas; corpo da espermateca com cerca de 8 anéis em que o anel apical está reduzido a uma lâmina que contém a cabeça ..... *Phlebotomus (Paraphlebotomus) alexandri*\*

- Faringe com as malhas fracas e alongadas terminando numa ponta longa e sinuosa; corpo da espermateca com cerca de 5 anéis em que o anel apical é sésil e isodiamétrico (Fig. 28) ..... *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti*



**Figura 28** - Espermateca de *P. sergenti* (fotografia de Sofia Branco, exemplar de Torres Novas, 2010, observado por microscopia óptica e esquema adaptado de Pires, 2000).

## 2.4 - Fotografias

As fotografias de microscopia óptica foram obtidas com uma câmara digital (Casio®, EX-H15), e tratadas com o software Image J®, Software Tools for Microscopes, para escalamento das mesmas, após calibração de acordo com instruções do fornecedor.

Para obtenção de fotografias de macroscopia, também com uma câmara digital, foi utilizada uma HP® Photosmart R840.

## 2.5 - Parâmetros determinados neste estudo

Durante o estudo realizado foram determinados vários parâmetros para caracterizar a fauna flebotomínica do Concelho de Torres Novas:

- Abundância relativa - número de exemplares capturados de uma espécie de flebótomo, sobre o número total de exemplares capturados das várias espécies, a multiplicar por cem (%)
- Densidade flebotomínica - número de flebótomos capturados por espécie, por armadilha CDC e por noite.
- Razão dos sexos - número total de machos a dividir pelo número total de fêmeas.
- Proporção de fêmeas alimentadas/grávidas – número de fêmeas flebotomínicas alimentadas/grávidas, sobre o número total de fêmeas capturadas, a multiplicar por cem (%).
- Taxa de infecção por *Leishmania* - número de fêmeas flebotomínicas infectadas com *Leishmania* sobre o número total de fêmeas analisadas, a multiplicar por cem (%).
- Taxa de infestação por ectoparasitas – número de ectoparasitas detectados, sobre o número total de flebótomos capturados, a multiplicar por cem (%).

## 2.6 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao programa SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) Statistics, versão 19.

Os testes não paramétricos de Mann-Whitney U (para duas amostras) e Kruskal-Wallis (para mais do que duas amostras), ao nível de significância de 5% foram utilizados para comparar as densidades flebotomínicas entre freguesias, e entre os vários tipos de biótopos.

O teste não paramétrico de Spearman, a um nível de significância de 5% foi usado para determinar o coeficiente de correlação entre as várias espécies flebotomínicas, e entre as diferentes espécies flebotomínicas e as espécies de possíveis hospedeiros vertebrados.

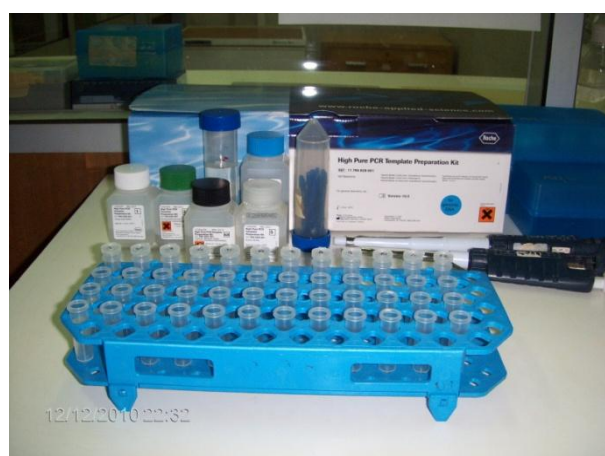
Para determinar factores de risco para a presença das várias espécies flebotómicas foi realizada uma análise de regressão logística simples e múltipla, ao nível de significância de 5%.

Os factores analisados na regressão simples incluíram as condições climáticas, como temperaturas, humidades relativas médias, e nível de vento (de 0 a 3), a altitude (inferior ou superior/igual a 100 m), o nível de abrigo (de 0 a 5), a presença das várias espécies de vertebrados domésticos num raio de 30 m da armadilha CDC, o tipo principal de biótopo e o tipo de abrigo animal nos biótopos peridomésticos, a vegetação dominante, a presença de armazéns de lenha e a presença de cães com coleiras ou substâncias repelentes.

Para a análise multivariada foram utilizadas as variáveis que na análise bivariada apresentaram, individualmente, uma associação estatisticamente significativa com a presença/ausência de flebótomos. Inclui-se ainda, nesta análise, a temperatura e humidade relativa média, mas apenas os dados fornecidos pelo Instituto de Meteorologia, I.P, Portugal, uma vez que as medições realizadas na altura de colocação e recolha das armadilhas não foram efectuadas sempre à mesma hora, e a humidade relativa média local apenas foi registada em 209, dos 275 biótopos prospectados.

## 2.7 - Análise molecular

### 2.7.1 - Extracção de DNA a partir de flebotomos



**Figura 29** - Material utilizado para a extracção de DNA a partir de flebótomos

A extracção de DNA foi realizada com o Kit “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche® Mannheim, Alemanha) de acordo com instruções do fornecedor (Fig. 29):

1- Lise das células e inactivação das nucleases

Cada flebotómo (menos a genitália), armazenado num tubo Eppendorf de 1,5 ml com tampão de lise (4 M ureia, 200 mM NaCl, 200 mM EDTA, pH 7,4), foi macerado com uma seta de plástico até se obter uma solução homogénea. Adicionou-se 200 µl de tampão de ligação [6 M guanidina-HCl, 10 mM ureia, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-100 (v/v), pH 4,4]. Os tubos foram levados ao vórtex para homogeneizar, e incubados a 70°C durante dez minutos.

2- Ligação dos ácidos nucleicos celulares a fibras de vidro contidas no tubo de extracção

Após a incubação, adicionou-se 100 µl de isopropanol, homogeneizou-se no vórtex, passou-se o produto para a coluna de extracção combinada com o tubo de recolha e centrifugou-se a 8000 rpm (Eppendorf®, Centrifuge 5810R), durante dois minutos.

3- Remoção de possíveis inibidores da reacção de PCR

Após centrifugação, combinou-se a coluna com um novo tubo e desprezou-se o fluido recolhido. Adicionou-se 500 µl de tampão de remoção (5M guanidina-HCl, 20 mM Tris-HCl, pH 6,6) e centrifugou-se a 8000 rpm durante dois minutos. Descartou-se o fluido e combinou-se com novo tubo de recolha

4- Purificação para remover componentes celulares contaminantes

Seguiram-se duas purificações com tampão de lavagem (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5) centrifugando-se duas vezes a 8000 rpm, durante dois minutos, e uma centrifugação final a 14000 rpm, durante um minuto, para remover possíveis vestígios do tampão de lavagem. Após a última centrifugação, a coluna foi combinada com um tubo Eppendorf de 1,5 ml.



#### 5- Libertação dos ácidos nucleicos da fibra de vidro – eluição

Adicionou-se à coluna 200 µl de tampão de eluição (10 mM Tris, pH 8,5), previamente aquecido a 70°C em banho-maria, e centrifugou-se a 8000 rpm durante dois minutos. Descartou-se a coluna, e o tubo Eppendorf final, contendo o DNA eluído, foi conservado a 4°C para posterior utilização.

#### **2.7.2 - Detecção de DNA de *Leishmania* sp.**

A detecção de DNA de *Leishmania* nos flebótomos capturados foi realizada com base na técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR) e de PCR seguido de polimorfismo de hidrólise com enzimas de restrição (RFLP). Dependendo das espécies flebotomínicas em análise um ou outro método, ou uma combinação de ambos, foram utilizados.

Assim, para os exemplares de *P. perniciosus* e *P. ariasi* (Subgénero *Larrousius*), vectores comprovados de *L. infantum* em Portugal (Pires, 1984) foi realizada uma reacção de PCR com as sequências oligonucleotídicas iniciadoras (“primers”) MC1 e MC2 do cinetoplasto de *L. infantum* (Cortes *et al.*, 2004) e para os exemplares das restantes espécies flebotomínicas capturadas, ou no caso de amostras positivas com os primeiros “primers”, realizou-se uma reacção de PCR com “primers” ITS1, seguida de RFLP com a enzima de restrição HaeIII.

Em todos os ensaios de PCR realizados, um controlo positivo contendo DNA genómico de *L. infantum* e um controlo negativo sem DNA (contendo água ultrapura) foram incluídos.

Os produtos de amplificação das várias PCR efectuadas foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE a 1x (0,04M Tris-Hcl a pH 8; 0,002M EDTA; 0,02 M acetato de sódio), corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e utilizando-se um marcador de 100 pb. Aplicou-se uma corrente eléctrica de 110V durante 60 minutos. Excepcionalmente, para o produto digestão com a enzima HaeIII, o gel de agarose foi efectuado a 2,5%, submetido a corrente eléctrica de 110V durante 100 minutos e utilizado um marcador de 50 pb.

Para a visualização dos produtos de amplificação no gel, utilizou-se um sistema de iluminação ultravioleta, sendo de seguida fotografados no sistema UVIDOC (Alfagene, Fords, USA).

A extracção de DNA e a PCR foram realizadas em áreas separadas para evitar contaminações.

### 2.7.2.1 - Amplificação do DNA cinetoplastideal com sequências iniciadoras MC

Os “*primers*” MC (MC1 e MC2, Quadro 7) foram desenhados a partir de uma sequência completa do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *L. infantum* e são específicos para espécies do complexo *L. donovani*. Em teoria, amplificam uma sequência com 447 pares de base, dos quais 42 pb pertencem à região conservada do minicírculo e os restantes (405 pb) à região variável.

A sequência MC1 encontra-se na região variável e a sequência MC2 encontra-se na região conservada (Cortes, 2008). Este método é considerado bastante sensível sendo capaz de detectar até um único parasita em amostras de cultura de *L. infantum*. (Cortes *et al.*, 2004).

**Quadro 7** - Sequências dos “*primers*” MC (MC1 e MC2).

“ <i>Primers</i> ”	Sequência
MC1	5' GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3'
MC2	5' CACCCATTTTCCGATTTTG 3'

As misturas de reacção foram inicialmente preparadas com grupos de 4 amostras de DNA (“*pools*”) perfazendo um volume de 25 µl: 2,5 µl de cada amostra, tampão de reacção NH<sub>4</sub> 1X (16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67mM Tris-HCl (pH 8.8)), 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol de cada “*primer*” (MC1 e MC2) , 1 U de *Taq* polimerase e água ultra pura para perfazer o volume. Para “*pools*” com resultado positivo preparou-se uma mistura de reacção individual para cada amostra com o mesmo volume final e a mesma composição de reagentes, à excepção do volume de amostra que foi neste caso de 5 µl.

O protocolo de amplificação, realizado no termociclador Biometra®, T1 thermocycler está indicado no Quadro 8.

**Quadro 8** - Condições de amplificação do kDNA com os “primers” MC (MC1 e MC2)

Fase	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	2 min	1
Desnaturação	94°C	20 seg	30
Hibridação	60°C	20 seg	
Extensão	72°C	30 seg	
Extensão final	72°C	5 min	1

### 2.7.2.2 - Amplificação do DNA ribossomal com sequências iniciadoras ITS1

Os primers ITS1 (LITSR e L5.8S, Quadro 9) foram desenhados a partir do DNA ribossomal (rDNA) de *Leishmania*, e amplificam a sequência do espaço interno transcrito 1 (ITS1 - *internal transcribed spacer* 1), que separa o gene da subunidade pequena do rDNA e o gene 5.8 RNA. Esta é uma sequência de 300 a 350 pb que varia em tamanho e em número de nucleótidos entre as várias espécies de *Leishmania*. A principal vantagem do ITS1-PCR é a seguinte: através da digestão do produto de PCR com apenas uma enzima de restrição, a enzima HaeIII, é possível identificar a maioria das espécies de *Leishmania*, com importância médica, pela observação do padrão de bandas resultante no gel de agarose, após electroforese (Schönian *et al.*, 2003).

**Quadro 9** - Sequências dos “primers” ITS1 (LITSR e L5.8S).

“Primers”	Sequência
LITSR	5'- CTGGATCATTTTCCGATG-3'
L5.8S	5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'

As misturas de reacção foram inicialmente preparadas com grupos de 4 amostras de DNA (“pools”) perfazendo um volume de 50 µl: 2 µl de cada amostra, tampão de reacção NH<sub>4</sub> 1X (16 mM ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mM Tris—HCl, (pH 8,8)), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 25 pmol de cada ” primer” (LITSR e L5.8S), 1 U de Taq polimerase e

água ultra pura para perfazer o volume. Para “*pools*” com resultado positivo, ou amostras positivas com os “*primers*” MC, preparou-se uma mistura de reacção individual para cada amostra com o mesmo volume final e a mesma composição de reagentes, à excepção do volume de amostra que foi neste caso de 4 µl.

O protocolo de amplificação, realizado no termociclador Biometra®, T1 thermocycler está indicado no Quadro 10.

**Quadro 10** - Condições de amplificação do rDNA com os “*primers*” ITS1 (LITSR e L5.8S)

Fase	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	95°C	2 min	1
Desnaturação	95°C	20 seg	30
Hibridação	53°C	30 seg	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	6 min	1

### 2.7.2.3 - Polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição de DNA- RFLP

Após amplificação com as sequências iniciadoras ITS1, o produto de reacção foi sujeito a digestão com a enzima HaeIII, tendo cada reacção de hidrólise sido realizada num volume final de 20 µl: 2 µl de tampão de hidrólise específico para a enzima (10X), 1 µl de enzima HaeIII (10 U da endonuclease), 15 µl do DNA amplificado por PCR e 2 µl de água ultra-pura para perfazer o volume final. A incubação foi realizada a +37°C, por duas a três horas, e o produto de restrição sujeito a electroforese em gel de agarose, de acordo com as condições já referidas.

O controlo positivo e negativo da amplificação com os “*primers*” ITS1 foram também sujeitos a hidrólise, servindo como controlo nesta fase.

O número de fragmentos de restrição esperados, bem como a sua dimensão, difere para as três espécies de *Leishmania* mais comuns na região mediterrânica, permitindo a sua distinção: três fragmentos (184 pb, 72 pb e 55 pb) para *L. infantum*, quatro fragmentos (185 pb, 57 pb, 53 pb e 24 pb) para *L. tropica* e dois fragmentos (203 pb e 132 pb) para *L. major*.

### 2.7.3 - Análise das refeições sanguíneas

A análise das refeições sanguíneas dos flebótomos capturados foi realizada com base na técnica de PCR com os “*primers*” universais de vertebrados modificados CytB1-F e CytB2-R (Quadro 11) (Svobodová *et al.*, 2009). Originalmente desenhados a partir de regiões altamente conservadas do gene mitocondrial citocromo b (“cit b”) de vertebrados, por comparação de sequências de mamífero e de rã (Kocher *et al.*, 1989), estes amplificam uma região de aproximadamente 350 pb do gene citocromo b de uma grande variedade de potenciais hospedeiros vertebrados.

A detecção de DNA do hospedeiro vertebrado, no sangue ingerido, é possível até cerca de 96 horas após a refeição sanguínea, período após o qual o DNA se encontra degradado por acção das enzimas digestivas do insecto vector (Abbasi *et al.*, 2009).

**Quadro 11** - Sequências dos “*primers*” CytB1- F e CytB2-R, para amplificação de um segmento do gene citocromo b de vertebrados.

“ <i>Primers</i> ”	Sequência
CytB1-F	5'-CCATCCAACATYTCADCATGATGAAA-3'
CytB2-R	5'-GCHCCTCAGAATGATATTTGKCCTCA-3'

A mistura de reacção foi preparada para um volume total de 25 µl: 12,5 µl de Biomix, 0,5 de cada “*primer*” CytB1 – F e CytB2- R, 5 µl de cada amostra, e água ultrapura para perfazer o volume.

O protocolo de amplificação, realizado no termociclador Biometra®, T1 thermocycler está indicado no Quadro 12.

**Quadro 12** - Condições de amplificação de um fragmento do gene citocromo b de vertebrados com os “*primers*” cytB1- F e cytB2-R

Fase	Temperatura	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	40
Hibridação	55°C	1 min	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão final	72°C	7 min	1

Nos ensaios de PCR foi incluído um controlo positivo contendo DNA humano e um controlo negativo sem DNA (contendo água ultrapura).

Os produtos de amplificação (350 pb) foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE a 1x, corado com brometo de etídio (0,5µg/ml) e utilizando um marcador de 100 pb. Aplicou-se uma corrente eléctrica de 110V durante 60 minutos. Para a visualização dos produtos de amplificação no gel, utilizou-se um sistema de iluminação ultravioleta, sendo de seguida fotografados no sistema UVIDOC (Alfagene, Fords, USA).

### 2.7.3.1 - Purificação dos Produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi realizada directamente a partir do gel de agarose, com o “Kit” comercial “High Pure PCR Product Purification Kit” (Roche® Mannheim, Alemanha) de acordo com as instruções do fornecedor:

Este “kit” baseia-se na ligação específica do DNA amplificado a uma fibra de vidro existente na coluna de purificação, na presença de tiocianato de guanidina. O DNA é purificado através de uma série de lavagens e centrifugações, com o objectivo de remover “*primers*”, nucleótidos e outros sais resultantes do PCR. Por último, o DNA é eluído usando uma solução de baixa concentração salina.

Para aplicar o protocolo de purificação, as bandas específicas (350 pb) foram cortadas com uma lâmina de bisturi previamente limpa com etanol e colocadas, separadamente, em tubos Eppendorf de 1,5 ml. Adicionou-se 300 µl de tampão de ligação (3M tiocianato de guanidina, 10 mM Tris-HCl, 5% Etanol (v/v), pH 6,6) a cada

tubo, levou-se ao vórtex e incubou-se em banho-maria a 56°C durante 10 minutos. Após o gel estar totalmente dissolvido, adicionou-se 100 µl de isopropanol, homogeneizou-se no vórtex e passou-se o conteúdo para a coluna de purificação combinada com o tubo de recolha. Os tubos foram centrifugados a 14 000 rpm durante 1 minuto. De seguida, realizou-se uma dupla lavagem, durante 1 minuto a 14 000 rpm, com 500 µl e 200 µl de tampão de lavagem (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5) respectivamente. Para finalizar, o produto já purificado foi eluído da coluna de purificação, com 100 µl de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) e centrifugado a 14 000 rpm durante 1 minuto.

O DNA purificado foi conservado a -20°C até posterior utilização.

#### **2.7.4 - Sequenciação e análise dos segmentos de DNA purificados**

O DNA purificado foi enviado para sequenciação de ambas as cadeias nucleotídicas para o serviço StabVida (Portugal), utilizando como iniciadores os mesmos “*primers*” utilizados na amplificação (CytB1-F/CytB2-R para análise das refeições sanguíneas e MC1/MC2 para detecção de *Leishmania*).

A análise das sequências nucleotídicas obtidas foi realizada pela Unidade de Leishmanioses do IHMT, por pesquisa com o programa BLAST de nucleotídicos padrão, tendo como base de dados o GenBank. Um nível de homologia maior ou igual a 90% foi aceite como indicativo de elevado grau de confiança.

### 3 - Resultados

#### 3.1 - Aspectos bioecológicos das espécies flebotomínicas capturadas

##### 3.1.1 - Abundâncias relativas

No total, 1262 flebótomos foram capturados e identificados morfologicamente, 315 fêmeas e 947 machos (Quadro 13). Quatro das cinco espécies flebotomínicas assinaladas para Portugal foram identificadas:

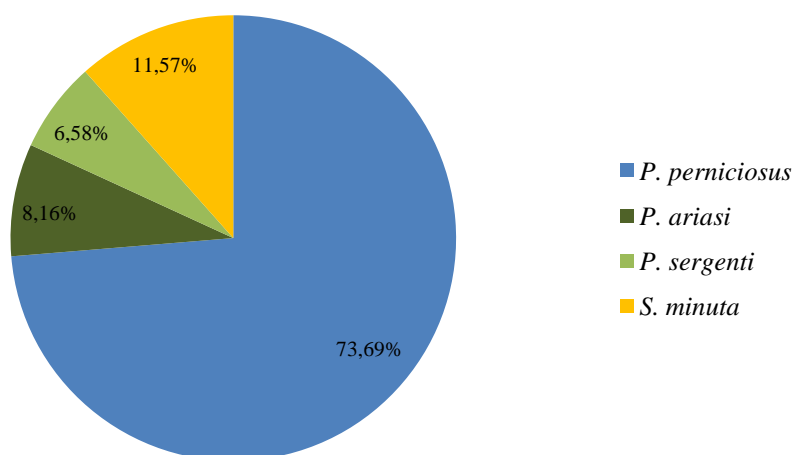
- *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921
- *Phlebotomus (Larroussius) perniciosus* Newstead, 1911
- *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917
- *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* (Rondani, 1843)

*P. perniciosus* foi a espécie mais abundante, representando 73,69% dos exemplares capturados, seguindo-se *S. minuta* com uma abundância relativa de 11,57%, *P. ariasi* com 8,16% e, por último, *P. sergenti* com 6,58% (Quadro 13, Fig. 30). Não se obtiveram *P. papatasi*.

**Quadro 13** - Número de flebótomos capturados no Concelho de Torres Novas, Portugal e sua abundância relativa (Junho a Novembro, 2010).

Espécies	Machos	Fêmeas	Total	%
<i>P. perniciosus</i>	746	184	930	73,69
<i>P. ariasi</i>	78	25	103	8,16
<i>P. sergenti</i>	44	39	83	6,58
<i>P. papatasi</i>	0	0	0	0,00
<i>S. minuta</i>	79	67	146	11,57
Total	947	315	1262	100,00





**Figura 30** - Abundância relativa (%) das várias espécies flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

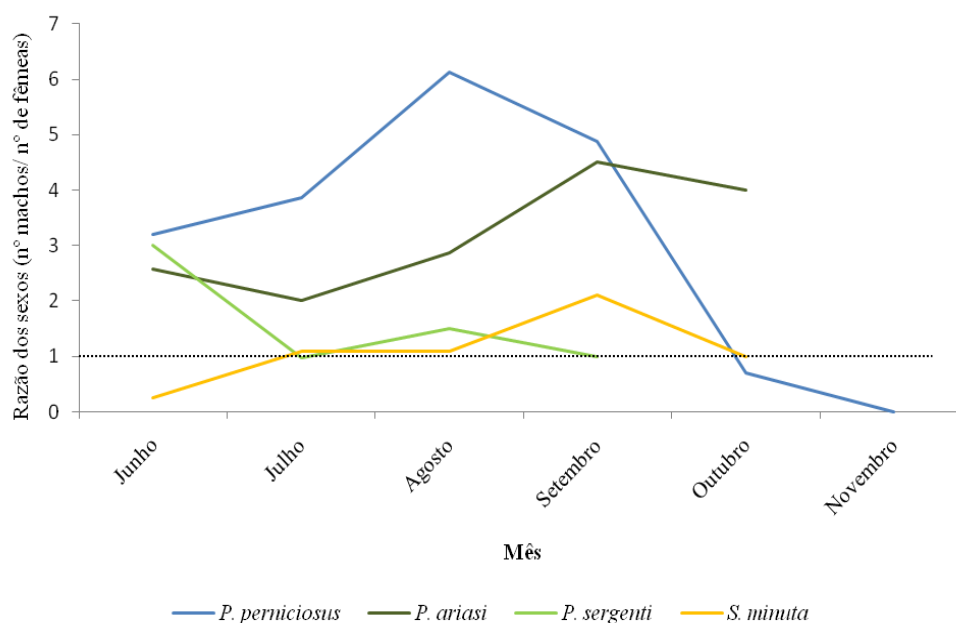
### 3.1.2 - Razão dos sexos

A razão dos sexos para o total das espécies foi de 3,0:1 machos por fêmea (947/315). Para *P. perniciosus* foi de 4,1:1 machos por fêmea (746/184), para *P. ariasi* 3,1:1 (78/25), para *P. sergenti* 1,1:1 (44/39) e para *S. minuta* 1,2:1 (79/67).

Assim, observou-se a predominância de machos, nos exemplares capturados de todas as espécies, sendo a diferença mais acentuada nas espécies do Subgénero *Larroussius* (*P. perniciosus* e *P. ariasi*), do que nas restantes (*P. sergenti* e *S. minuta*).

Observando-se a variação mensal da razão dos sexos por espécie (Fig. 31), verificou-se que o valor máximo se registou em Agosto para *P. perniciosus* (6,1:1), em Setembro para *P. ariasi* (4,5:1) e *S. minuta* (2,1:1), e em Junho para *P. sergenti* (3,0:1).

Para todas as espécies flebotomínicas, observou-se um decréscimo no valor desta razão, do penúltimo para o último mês em que se detectou actividade da espécie.



**Figura 31** - Variação mensal da razão dos sexos (número total machos/número total de fêmeas) para as espécies flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

### 3.1.3 - Fêmeas alimentadas e grávidas

**Quadro 14** - Número de fêmeas alimentadas e grávidas, das várias espécies flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

Espécie flebotomínica	Fêmeas		
	Alimentadas	Grávidas	Total
<i>P. perniciosus</i>	27	12	184
<i>P. ariasi</i>	4	4	25
<i>P. sergenti</i>	9	14	39
<i>S. minuta</i>	2	1	67
Total	42	31	315

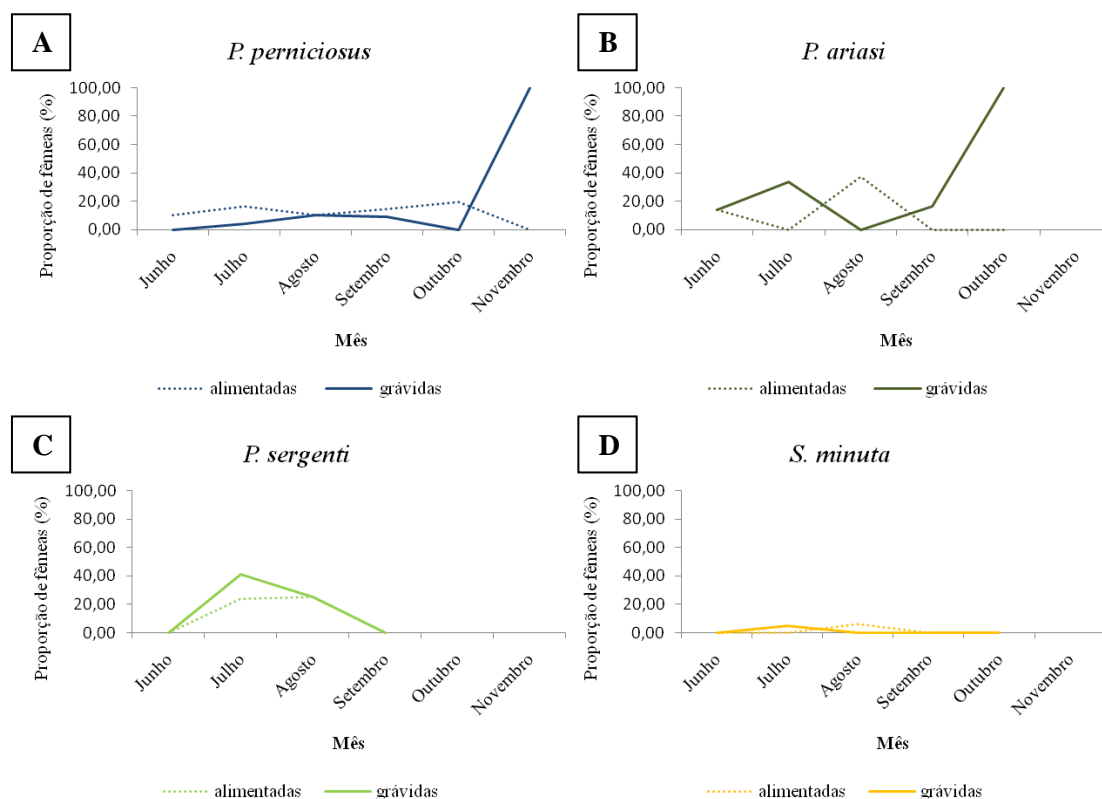
Das 315 fêmeas capturadas verificou-se que 42 (13,33%) se encontravam alimentadas, com sangue fresco no abdómen, e que 31 (9,84%) estavam grávidas (com ovos no abdómen) (Quadro 14).

A variação mensal da proporção de fêmeas alimentadas e grávidas, por espécie pode ser observada na figura 32.

Para *P. perniciosus* e *P. ariasi* (Fig. 32 - A e B) constatou-se que a maior proporção de fêmeas grávidas (100%), em Novembro e Outubro, respectivamente, ocorreu no último mês em que foi detectada actividade da espécie. Aquela observou-se posteriormente à maior proporção de fêmeas alimentadas de cada uma das espécies (19,4% em Outubro para *P. perniciosus* e 37,5% em Agosto para *P. ariasi*).

*P. sergenti* (Fig. 32 - C) apresentou a maior percentagem de fêmeas alimentadas durante o mês de Agosto, (25,0%) e de grávidas (41,4%) durante o mês de Julho.

Para *S. minuta* (Fig. 32 - D) a percentagem de fêmeas alimentadas e grávidas foi inferior em todos os meses em que se assinalou a presença desta espécie, nunca ultrapassando os 6%, em qualquer dos casos.



**Figura 32** - Proporção de fêmeas alimentadas e grávidas das várias espécies flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas e sua variação mensal (Junho a Novembro, 2010): A - *P. perniciosus*, B - *P. ariasi*, C - *P. sergenti*, D - *S. minuta*.

Em nenhuma das fêmeas se observaram anomalias nas espermatecas.

### 3.1.4 - Rotação da genitália dos machos

Foi capturado um macho de *P. sergenti* com rotação incompleta da genitália, num ângulo de 90° (em Julho, numa coelheira/pocilga). Em todos os restantes machos, das várias espécies, a genitália estava com a rotação completa (rotação de 180°).

### 3.1.5 - Ecto e endoparasitas (não *Leishmania*) em flebótomos capturados

Durante a identificação morfológica dos flebótomos, detectou-se um macho de *P. perniciosus* (capturado num curral de ovelhas, em Setembro) parasitado com dois ácaros (Fig. 33), traduzindo-se numa taxa de infestação para esta espécie de 0,22% (2/930) e uma taxa de infestação para o total de flebótomos capturados de 0,16% (2/1262).



**Figura 33** - *P. perniciosus* macho, parasitado por dois ácaros (fotografia de Sofia Branco, exemplar de Torres Novas, 2010).

Contrariamente ao observado na Região Algarvia, no mesmo ano (Maia *et al.*, 2011), não foram capturados exemplares parasitados por nemátodes (Fig. 34).



**Figura 34** - Pormenor de *P. perniciosus* fêmea parasitada por um nemátode (fotografia de Sofia Branco, exemplar capturado no Algarve, 2010 – Maia *et al.*, 2011).

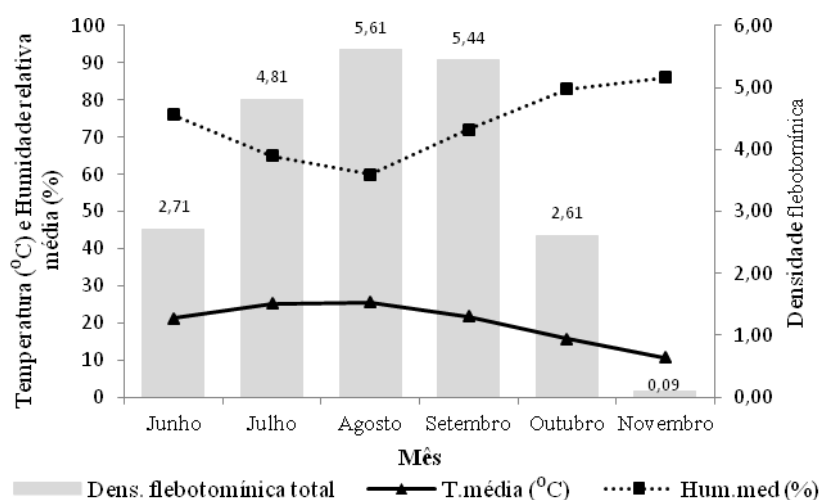
### 3.2 - Período de actividade, densidades flebotomínicas mensais e sua variação

**Quadro 15** - Densidades flebotomínicas por espécie e por mês no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

Mês	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Total de Junho a Novembro
<i>P. perniciosus</i>	1,50	3,31	3,92	4,54	2,30	0,09	3,38
<i>P. ariasi</i>	0,89	0,13	0,44	0,47	0,22	0	0,38
<i>P. sergenti</i>	0,14	0,79	0,28	0,03	0,00	0	0,30
<i>S. minuta</i>	0,18	0,58	0,97	0,40	0,09	0	0,53
Total	2,71	4,81	5,61	5,44	2,61	0,09	4,59

Densidade - N° de flebótomos capturados por armadilha CDC/noite

Para a densidade flebotomínica total no Concelho, de 12 de Junho a 21 de Novembro de 2010 (Quadro 15), obteve-se uma média de 4,59 flebótomos/armadilha CDC/noite (1262 /275). As maiores densidades foram observadas nos meses de Agosto e Setembro com 5,61 flebótomos/armadilha CDC/noite e 5,44 flebótomos/armadilha CDC/noite, respectivamente (Fig. 35). Agosto foi também o mês em que se verificaram as temperaturas média, máxima e mínima mais elevadas e a humidade relativa média mais baixa (ponto 3.3). De Junho a Setembro todas as espécies foram detectadas mensalmente.



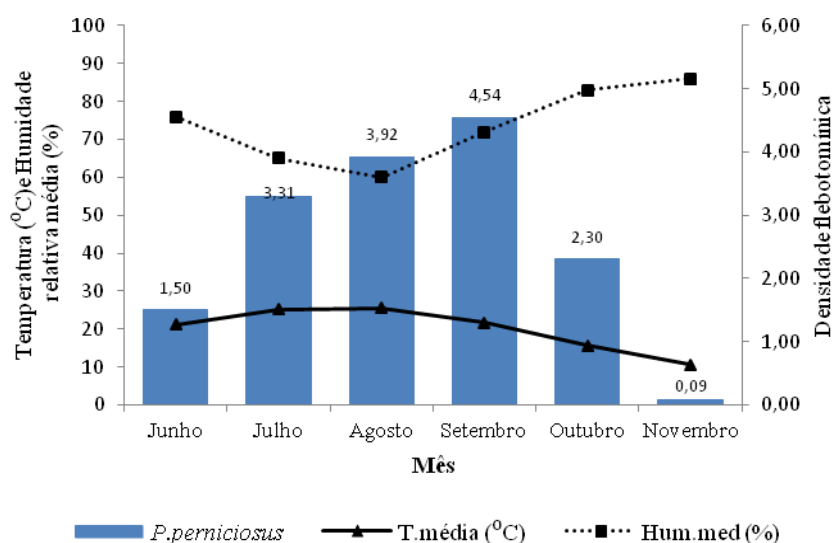
**Figura 35** - Densidades flebotomínicas totais (número de flebótomos/armadilha CDC/noite), temperatura média e humidade relativa média no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

### 3.2.1 - *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus* Newstead, 1911

Esta espécie foi a que apresentou as maiores densidades durante o período de amostragem, com uma média de 3,38 flebótomos/armadilha CDC/noite. Apresentou uma evolução unimodal, com uma densidade máxima observada em Setembro (4,54 flebótomos/armadilha CDC/noite) (Fig. 36).

Foram capturados exemplares de *P. perniciosus* em todos os meses de amostragem, desde Junho, com uma densidade de 1,50 flebótomos/armadilha CDC/noite, até Novembro de 2010, tendo a densidade, neste último mês, tido o seu valor mínimo de 0,09 flebótomos/armadilha CDC/noite.

A actividade desta espécie decorreu de 12 de Junho (data da primeira amostragem) a 6 de Novembro, não se tendo após esta data capturado exemplares, apesar de se terem realizado prospecções até dia 21 de Novembro.



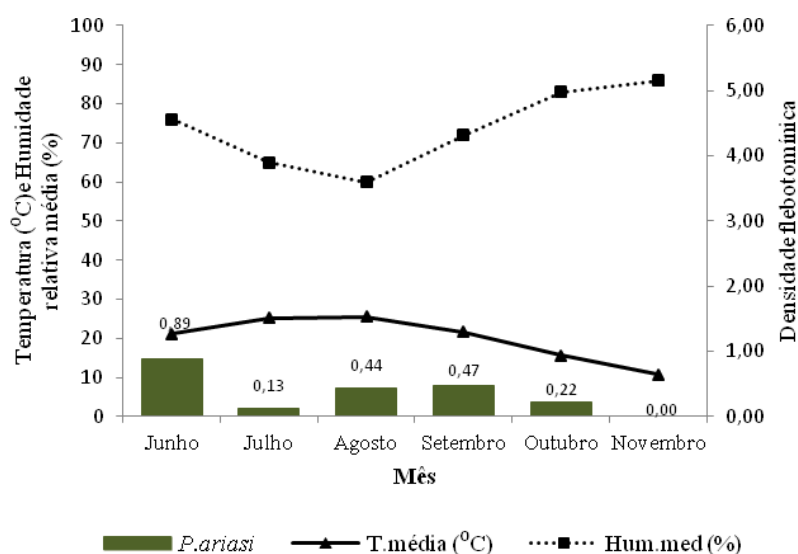
**Figura 36** - Variação mensal da densidade de *P. perniciosus* (número de flebótomos/armadilha CDC/noite), temperatura média e humidade relativa média no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

### 3.2.2 - *Phlebotomus (Larroussius) ariasi* Tonnoir, 1921

A densidade de *P. ariasi* (Fig. 37) variou entre um mínimo de 0,13 flebótomos/armadilha CDC/noite, em Julho e um máximo de 0,89 flebótomos/armadilha CDC/noite em Junho, tendo sido o valor médio mensal de 0,37 flebótomos/armadilha CDC/noite.

A evolução foi bimodal, com o maior pico em Junho (0,89 flebótomos/armadilha CDC/noite) e um segundo pico, de menor intensidade, em Setembro (0,47 flebótomos/armadilha CDC/noite).

Verificou-se a ocorrência de *P. ariasi* de 12 de Junho a 24 de Outubro de 2010.



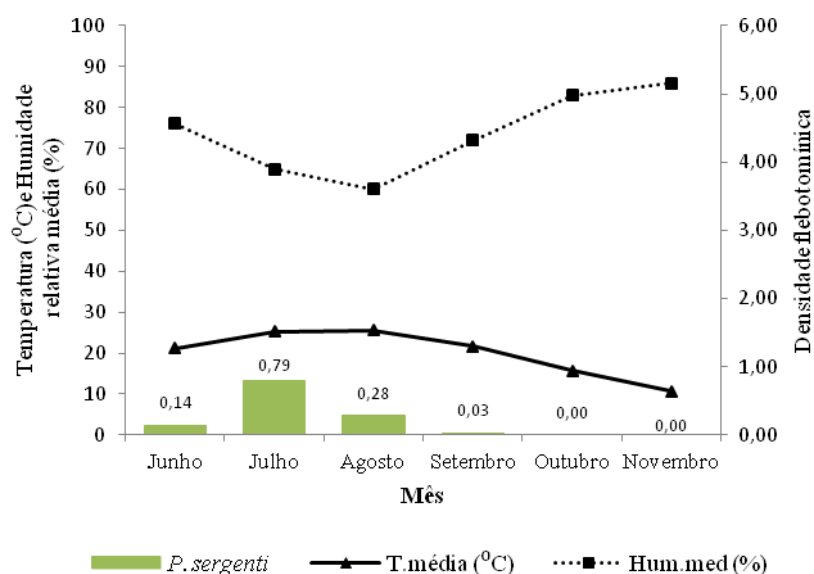
**Figura 37** - Variação mensal da densidade de *P. ariasi* (número de flebótomos/armadilha CDC/noite), temperatura média e humidade relativa média no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

### 3.2.3 - *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917

A densidade média desta espécie (Fig. 38), de Junho a Novembro de 2010, foi de 0,30 flebótomos/armadilha CDC/noite. Evoluiu de 0,14 flebótomos/armadilha CDC/noite em Junho, para um máximo de 0,79 flebótomos/armadilha CDC/noite em Julho, após o que diminuiu progressivamente para o valor mínimo de 0,03 flebótomos/armadilha CDC/noite observado em Setembro. *P. sergenti* apresentou assim uma evolução unimodal com um pico de maior densidade em Julho.

Verificou-se a ocorrência de *P. sergenti* de 13 de Junho a 20 de Setembro. Nos meses de Outubro e Novembro não se capturaram exemplares desta espécie.





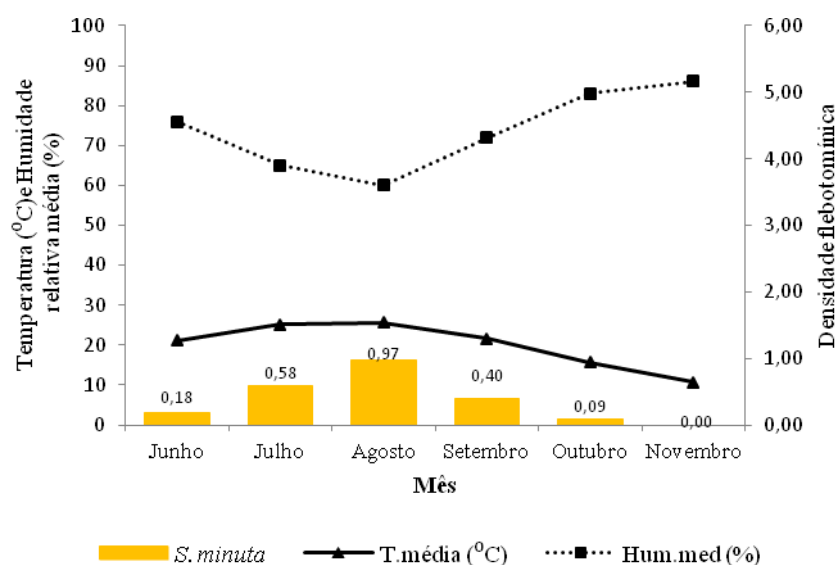
**Figura 38** - Variação mensal da densidade de *P. sergenti* (número de flebótomos/armadilha CDC/noite), temperatura média e humidade relativa média no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

### 3.2.4 - *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* (Rondani, 1843)

*Sergentomyia minuta* foi a segunda espécie que apresentou densidade mais elevada, com uma média de 0,53 flebótomos/armadilha CDC/noite durante o período de amostragem.

A evolução foi unimodal (Fig. 39), iniciando-se com uma densidade de 0,18 flebótomos/armadilha CDC/noite em Junho, atingindo o máximo de 0,97 flebótomos/armadilha CDC/noite em Agosto e decrescendo, após este mês, até atingir o valor mínimo de 0,09 flebótomos/armadilha CDC/noite em Outubro.

Esta espécie foi capturada de 12 de Junho a 16 de Outubro.

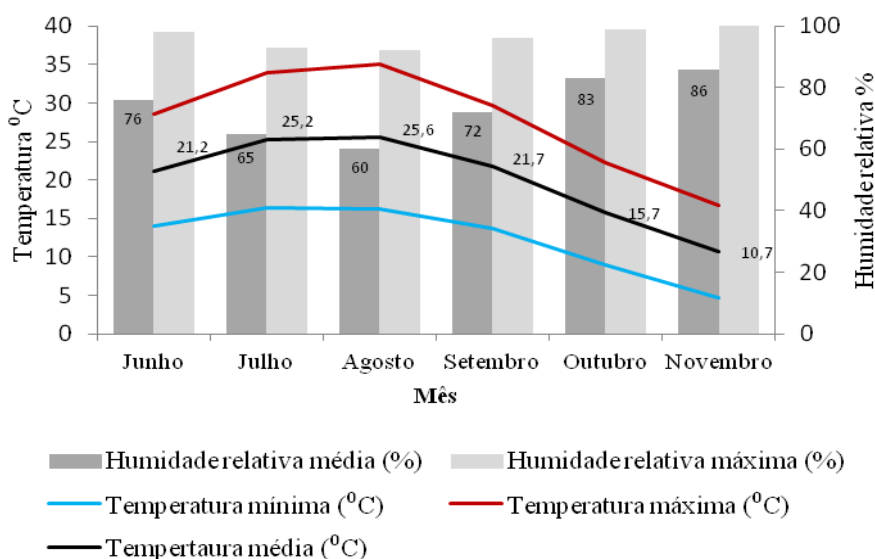


**Figura 39** - Variação mensal da densidade de *S. minuta* (número de flebotomos/armadilha CDC/noite), temperatura média e humidade relativa média no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

### 3.3 - Temperaturas e humidades relativas mensais

De acordo com os dados fornecidos pelo Instituto de Meteorologia, I.P. Portugal (anexo 4, Fig. 40), a temperatura média do ar no Concelho durante o período de prospecção (Junho a Novembro, 2010) variou entre 10,7°C e 25,6°C, sendo assim a amplitude térmica de 14,9°C. Os meses mais quentes foram os de Julho e Agosto, com 25,2°C e 25,6°C, respectivamente, e o mês mais frio o de Novembro com 10,7°C. Concordantemente, a temperatura máxima registou-se em Agosto com um valor de 35°C e a temperatura mínima em Novembro, com 4,7°C.

Para a humidade relativa observou-se o inverso da temperatura: no mês de Agosto registaram-se os valores de humidade relativa média (60%) e máxima (92%) mais baixos, e no mês de Novembro os valores mais elevados (86% de humidade relativa média e 100% de máxima).



**Figura 40** - Variação mensal da temperatura (média, mínima e máxima, em °C) e humidade relativa (média e máxima, em %) no Concelho de Torres Novas, no período de Junho a Novembro de 2010.

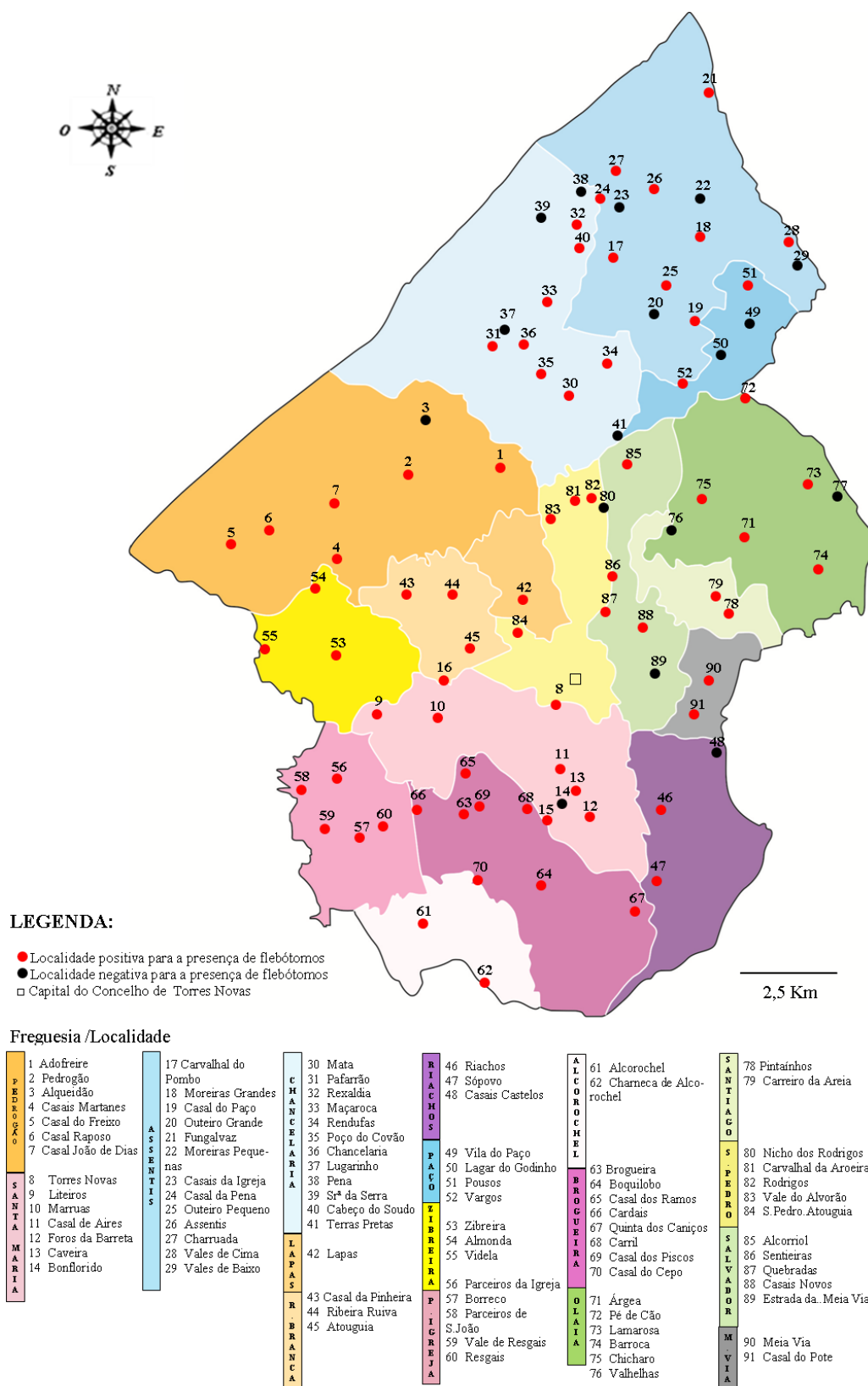
### 3.4 - Distribuição geográfica

No total, 275 biótopos foram prospectados no Concelho de Torres Novas distribuindo-se por 91 localidades e abrangendo todas as 17 freguesias.

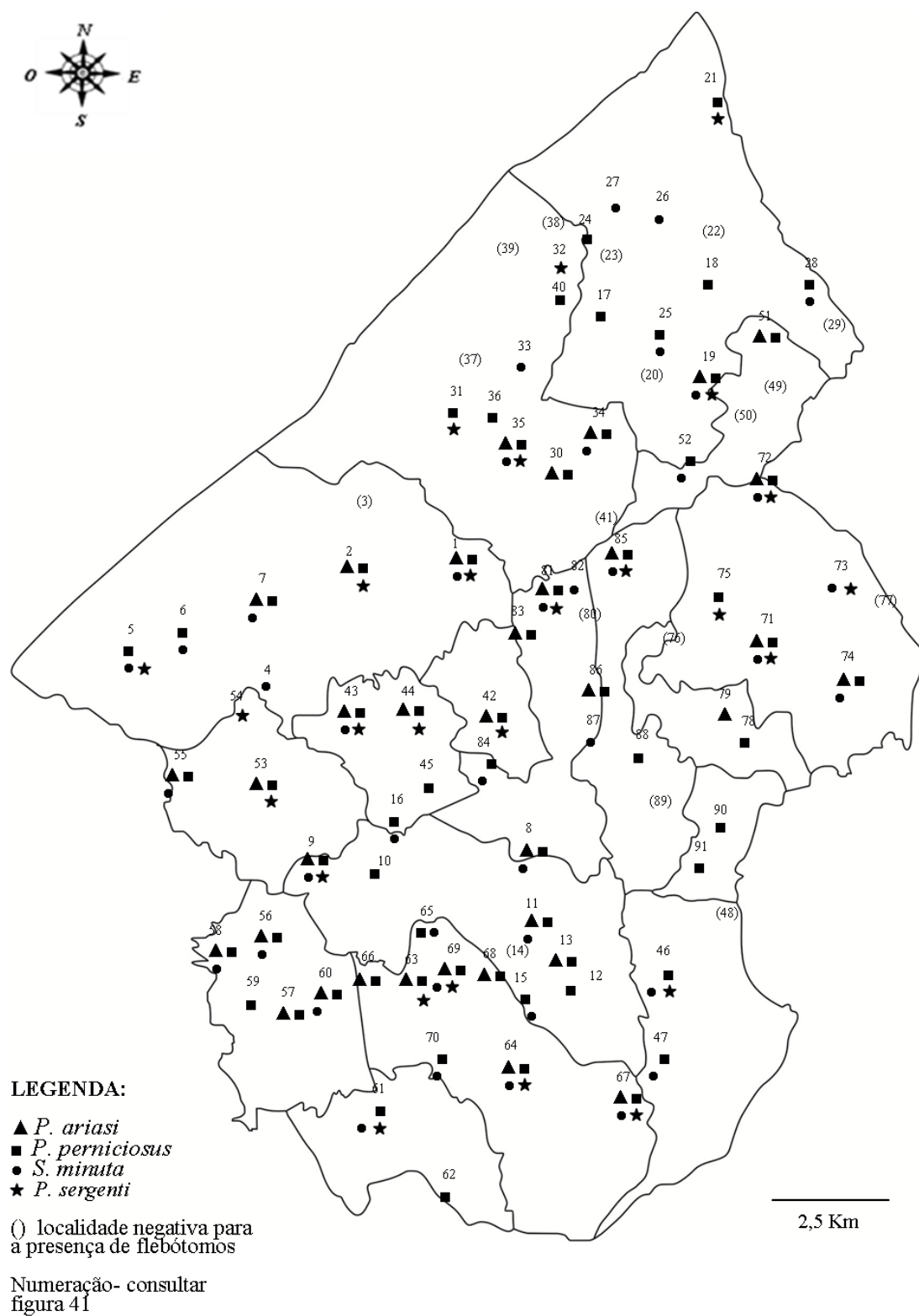
Verificou-se a presença de pelo menos uma espécie flebotomínica em 75 das localidades prospectadas, ou seja, 82% (75/91) das localidades foram positivas para a presença de flebótomos (Fig. 41).

Em relação às espécies flebotomínicas (Fig. 42, Quadro 16), assinalou-se a presença de *P. perniciosus* em 70,3% (64/91) das localidades amostradas, sendo a espécie com maior distribuição geográfica no Concelho. *P. ariasi* foi assinalado em 38,5% (35/91) das localidades, *P. sergenti* em 28,6% (26/91) e *S. minuta* em 45,1% (41/91).

De notar que em 71,4% (65/91) das localidades se detectou a presença de pelo menos uma das espécies comprovadamente vectoras de *L. infantum* em Portugal (*P. perniciosus* ou *P. ariasi*).



**Figura 41** - Freguesias e localidades prospectadas para a presença de flebotomos no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010)



**Figura 42** - Espécies flebotomínicas capturadas, por localidade, no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

**Quadro 16** - Lista das localidades prospectadas no Concelho de Torres Novas, latitudes, longitudes, altitudes médias dos biótopos e espécies flebotomínicas encontradas (Junho a Novembro, 2010).

Freguesia	Nº loc.	Localidade	Nº CDC	Latitude (N)	Longitude (O)	Alt. média	Espécies flebotomínicas			
							<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>S. minuta</i>
Pedrogão	1	Adofreire	18	39°31'/032'	8°34'	90	+	+	+	+
	2	Pedrogão	8	39°31'	8°35'/36'	118	+	+	+	-
	3	Alqueidão	4	39°32'	8°35'	120	-	-	-	-
	4	Casais Martanes	4	39°30'	8°37'	95	-	-	-	+
	5	Casal do Freixo	1	39°30'	8°39'	157	+	-	+	+
	6	Casal Raposo	1	39°31'	8°38'	130	+	-	-	+
	7	Casal João de Dias	1	39°31'	8°38'	125	+	+	-	+
Santa Maria	8	Torres Novas	8	39°28'	8°33'	70	+	+	-	+
	9	Liteiros	6	39°28'	8°36'	128	+	+	+	+
	10	Marruas	1	39°28'	8°35'	117	+	-	-	-
	11	Casal de Aires	1	39°27'	8°33'	76	+	+	-	+
	12	Foros da Barreta	1	39°27'	8°32'	63	+	-	-	-
	13	Caveira	1	39°27'	8°32'	55	+	+	-	-
	14	Bonflorido	1	39°27'	8°33'	31	-	-	-	-
	15	Vale do Carvão	2	39°27'	8°33'	64	+	-	-	+
Assentis	16	Barreira Alva	2	39°29'	8°35'	122	+	-	-	+
	17	Carvalho do Pombo	2	39°34'	8°31'/32'	158	+	-	-	-
	18	Moreiras Grandes	2	39°35'	8°31'	176	+	-	-	-
	19	Casal do Paço	4	39°33'	8°30'	86	+	+	+	+
	20	Outeiro Grande	2	39°33'/34'	8°31'	134	-	-	-	-
	21	Fungalvaz	4	39°36'/37'	8°30'	124	+	-	+	-
	22	Moreiras Pequenas	1	39°35'	8°30'	139	-	-	-	-
	23	Casais da Igreja	1	39°35'	8°31'	150	-	-	-	-
	24	Casal da Pena	1	39°35'	8°32'	112	+	-	-	-
	25	Outeiro Pequeno	2	39°34'	8°31'	138	+	-	-	+
	26	Assentis	2	39°35'	8°31'	117	-	-	-	+
	27	Charruada	2	39°36'	8°32'	144	-	-	-	+
Chancelaria	28	Vales de Cima	2	39°35'	8°29'	117	+	-	-	+
	29	Vales de Baixo	2	39°34'	8°28'	129	-	-	-	-
	30	Mata	6	39°32'/33'	8°32'/33'	115	+	+	-	-
	31	Pafarrão	4	39°33'	8°34'	73	+	-	+	-
	32	Rexaldia	2	39°35'	8°32'	121	-	-	+	-
	33	Maçaroca	2	39°33'	8°33'	82	-	-	-	+
	34	Rendufas	3	39°33'	8°32'	125	+	+	-	+
	35	Poço do Covão	7	39°33'	8°33'	67	+	+	+	+
	36	Chancelaria	1	39°33'	8°33'	61	+	-	-	-
	37	Lugarinho	1	39°33'	8°34'	84	-	-	-	-
	38	Pena	1	39°35'	8°32'	114	-	-	-	-
	39	Srª Da Serra	1	39°35'	8°33'	172	-	-	-	-
Lapas	40	Cabeço do Soudo	2	39°34'	8°32'	136	+	-	-	-
	41	Terras Pretas	2	39°32'	8°31'	129	-	-	-	-
Ribeira Branca	42	Lapas	5	39°30'	8°33'/34'	66	+	+	+	-
	43	Casal da Pinheira	8	39°30'	8°35'/36'	92	+	+	+	+
	44	Ribeira Ruiva	2	39°30'	8°35'	74	+	+	+	-
Riachos	45	Atouguia	2	39°29'	8°34'	116	+	-	-	-
	46	Riachos	9	39°26'/27'	8°31'	38	+	-	+	+
	47	Sópovo	2	39°26'	8°31'	38	+	-	-	+
Paço	48	Casais Castelos	2	39°27'	8°30'	38	-	-	-	-
	49	Vila do Paço	2	39°33'	8°29'	140	-	-	-	-
	50	Lagar do Godinho	2	39°33'	8°30'	93	-	-	-	-
	51	Pousos	3	39°34'	8°29'	136	+	+	-	-
Zibreira	52	Vargos	3	39°33'	8°30'	130	+	-	-	+
	53	Zibreira	4	39°29'	8°37'	130	+	+	+	-
	54	Almonda	3	39°30'	8°37'/38'	95	-	-	+	-
	55	Videla	1	39°29'	8°38'	83	+	+	-	+
Parceiros da Igreja	56	Parceiros de Igreja	2	39°27'	8°36'	106	+	+	-	+
	57	Borreco	4	39°27'	8°36'	119	+	+	-	-
	58	Parc. de S.João	2	39°27'	8°37'	128	+	+	-	+

	59	Vale de Resgais	1	39°26'	8°37'	106	+	-	-	-
	60	Resgais	3	39°26'	8°36'	106	+	+	-	+
Alcorochel	61	Alcorochel	7	39°25'/26'	8°34'/35'	93	+	-	+	+
	62	Charneca de Alcorochel	1	39°24'	8°34'	102	+	-	-	-
Brogueira	63	Brogueira	3	39°27'	8°34'	101	+	+	+	-
	64	Boquilobo	5	39°26'	8°33'	49	+	+	+	+
	65	Casal dos Ramos	3	39°27'/28'	8°34'	104	+	-	-	+
	66	Cardais	4	39°26'/27'	8°35'	106	+	+	-	-
	67	Quinta dos Caniços	3	39°25'	8°31'	30	+	+	+	+
	68	Carril	2	39°27'	8°33'	83	+	+	-	-
	69	Casal dos Piscos	2	39°27'	8°34'	85	+	+	+	+
	70	Casal do Cepo	2	39°26'	8°34''	79	+	-	-	+
Olaia	71	Árgea	3	39°31'	8°29'	87	+	+	+	+
	72	Pé de Cão	5	39°32'	8°29'	96	+	+	+	+
	73	Lamarosa	3	39°31'/32'	8°28'	80	-	-	+	+
	74	Barroca	4	39°30'	8°28'	70	+	+	-	+
	75	Chicharo	2	39°31'	8°30'	124	+	-	+	-
	76	Valhelhas	2	39°31'	8°31'	135	-	-	-	-
	77	Caseiros	2	39°31'	8°28'	64	-	-	-	-
Santiago	78	Pintainhos	3	39°29'	8°30'	88	+	-	-	-
	79	Carreiro da Areia	2	39°30'	8°30'	86	-	+	-	-
São Pedro	80	Nicho dos Rodrigues	2	39°31'	8°32'	139	-	-	-	-
	81	Carvalho Aroeira	3	39°31'	8°32'	113	+	+	+	+
	82	Rodrigos	1	39°31'	8°32'	113	-	-	-	+
	83	Vale do Alvorão	3	39°31'	8°33'	76	+	+	-	-
	84	S. Pedro - Atouguia	1	39°29'	8°34'	113	+	-	-	+
Salvador	85	Alcorriol	4	39°32'	8°31'	144	+	+	+	+
	86	Sentieiras	3	39°30'	8°32'	95	+	+	-	-
	87	Quebradas	1	39°30'	8°32'	72	-	-	-	+
	88	Casais Novos	4	39°29'	8°32'	80	+	-	-	-
	89	Estrada Meia Via	2	39°29'	8°31'	40	-	-	-	-
Meia Via	90	Meia Via	3	39°29'	8°30'	98	+	-	-	-
	91	Casal do Pote	1	39°28'	8°30'	84	+	-	-	-

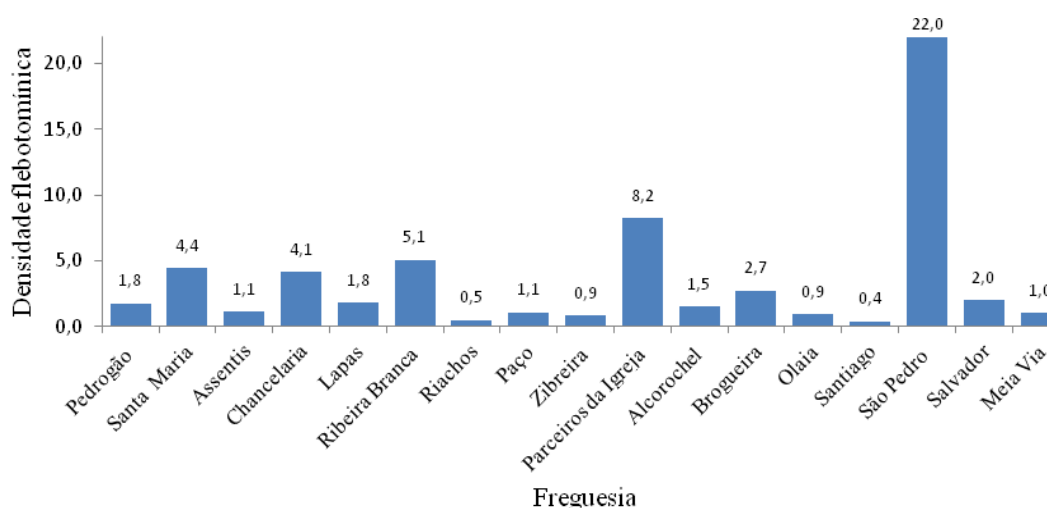
**Quadro 17** - Freguesias, coordenadas dos biótopos prospectados, espécies flebotomínicas detectadas no Concelho de Torres Novas e respectivas densidades (Junho a Novembro, 2010)

Freguesia	Nº de CDC	Coordenadas			Espécies flebotomínicas/ Densidades*							
		Latitude (N)	Longitude (O)	Altitude média	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>S. minuta</i>				
Pedrogão	37	39°31'/39°32'	8°34'//8°36'	104	+	1,8	+	1,1	+	0,3	+	0,5
Santa Maria	23	39°27'//39°29'	8°32'//8°36'	89	+	4,4	+	0,3	+	0,4	+	0,7
Assentis	27	39°33'/39°37'	8°28'//8°32'	128	+	1,1	+	0,1	+	0,2	+	0,2
Chancelaria	32	39°32'//39°35'	8°31'//8°34'	100	+	4,1	+	0,3	+	0,2	+	0,3
Lapas	5	39°30'	8°33'//8°34'	66	+	1,8	+	0,3	+	0,2	-	0,0
Ribeira Branca	11	39°29'//39°30'	8°34'//8°36'	93	+	5,1	+	0,4	+	1,1	+	1,7
Riachos	13	39°26'//39°27'	8°30'//8°31'	38	+	0,5	-	0,0	+	0,1	+	0,3
Paço	10	39°33'/39°34'	8°29'//8°30'	126	+	1,1	+	0,1	-	0,0	+	0,6
Zibreira	8	39°29'/39°30'	8°37'//8°38'	111	+	0,9	+	0,4	+	1,1	+	0,1
Parceiros da Igreja	12	39°26'//39°27'	8°36'//8°37'	114	+	8,2	+	0,5	-	0,0	+	0,2
Alcorochel	8	39°24'//39°26'	8°34'//8°35'	94	+	1,5	-	0,0	+	0,1	+	0,4
Brogueira	24	39°25'//39°28'	8°31'//8°35'	78	+	2,7	+	0,3	+	0,7	+	0,7
Olaia	21	39°30'//39°32'	8°28'//8°31'	91	+	0,9	+	0,3	+	0,2	+	0,4
Santiago	5	39°29'//39°30'	8°30'	87	+	0,4	+	0,2	-	0,0	-	0,6
São Pedro	10	39°29'//39°31'	8°32'//8°34'	107	+	22,0	+	0,2	+	0,1	+	0,7
Salvador	14	39°29'//39°32'	8°31'//8°32'	95	+	2,0	+	0,1	+	0,1	+	1,6
Meia Via	4	39°28'//39°29'	8°30'	94	+	1,0	-	0,0	-	0,0	-	0,0

\*Densidade - Nº de flebótomos capturados por armadilha CDC/noite

*P. perniciosus* foi capturado em todas as 17 freguesias do Concelho, *P. ariasi* e *S. minuta* em 14 e *P. sergenti* em 13. Em 10 das freguesias todas as quatro espécies foram detectadas (Quadro 17).

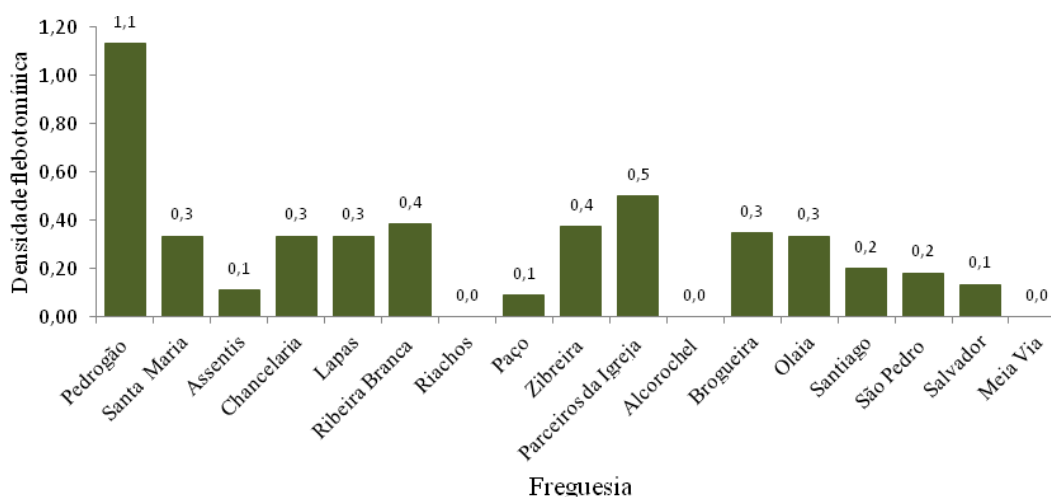
Para *P. perniciosus* (Fig. 43) as maiores densidades foram observadas na freguesia de São Pedro com 22 flebótomos/armadilha CDC/noite. Esta freguesia é também a mais densamente povoada com 641 habitantes por Km<sup>2</sup>. A diferença na distribuição das densidades entre esta freguesia, e as restantes freguesias agrupadas não foi, no entanto, significativa (U:1561,  $p=0,62$ ).



**Figura 43** - Densidade (número de flebótomos/armadilha CDC/noite) de *P. perniciosus* por freguesia no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

*P. ariasi* (Fig. 44) apresentou a densidade máxima na freguesia do Pedrogão com 1,1 flebótomos/armadilha CDC/noite. As diferenças na distribuição de densidades desta espécie entre o Pedrogão e as restantes freguesias agrupadas, foram significativas (U:5502,  $p=0,002$ ).





**Figura 44** - Densidade (número de flebotomos/armadilha CDC/noite) de *P. ariasi* por freguesia no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

As maiores densidades de *P. sergenti* (Quadro 17) foram observadas nas freguesias de Zibreira e Ribeira Branca, ambas com 1,1 flebotomos/armadilha CDC/noite e na freguesia da Brogueira com 0,7 flebotomos/armadilha CDC/noite. Comparando estas três freguesias com as restantes freguesias agrupadas as diferenças foram significativas (U:6421,  $p<0,001$ ).

Para *S. minuta* verificou-se que a freguesia da Ribeira Branca foi a que apresentou densidade mais elevada, com 1,7 flebotomos/armadilha CDC/noite, seguida pela freguesia de Salvador com 1,6 flebotomos/armadilha CDC/noite. As diferenças na distribuição de densidades entre estas freguesias, e as restantes agrupadas não foram significativas (U:2727,  $p=0,526$ ).

### 3.5 - Distribuição flebotomínica por tipo de biótopo

**Quadro 18** - Densidades flebotomínicas por tipo principal de biótopo no Concelho de Torres Novas  
(Junho a Novembro, 2010)

Tipo de biótopo	Densidades flebotomínicas*						Total
	<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>S. minuta</i>	♂	♀	
Doméstico	1,17	0,54	0,18	0,56	1,78	0,67	2,44
Peridoméstico	4,80	0,30	0,40	0,56	4,58	1,48	6,07
Silvático	1,47	0,21	0,00	0,16	1,37	0,47	1,84

\*Densidade - Nº de flebótomos capturados por armadilha CDC/noite

Dos vários tipos principais de biótopos prospectados (Quadro 18, Fig. 45) verificou-se que, em termos globais, as maiores densidades flebotomínicas foram observadas nos biótopos peridomésticos.

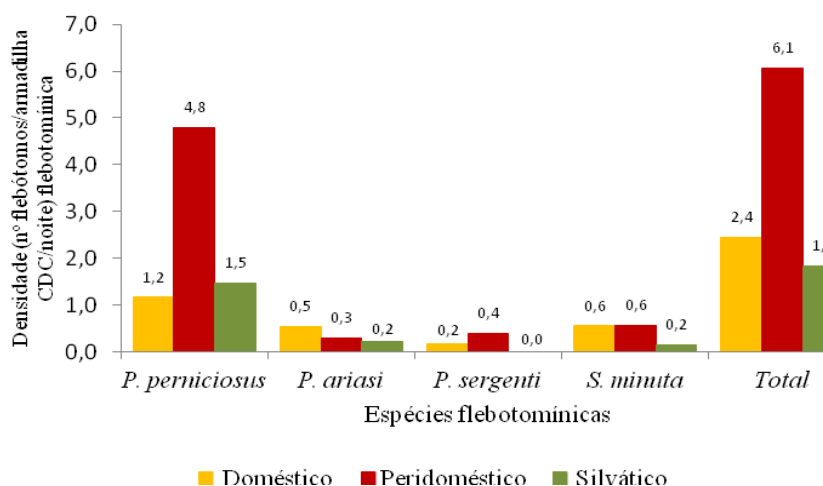
*P. perniciosus* é o principal responsável por esta tendência, com uma densidade de 4,8 flebótomos/armadilha CDC/noite em biótopos peridomésticos, valor que ultrapassa o dobro do observado em biótopos silváticos (1,5 flebótomos/armadilha CDC/noite) e biótopos domésticos (1,2 flebótomos/armadilha CDC/noite).

Para *P. sergenti* observou-se um resultado similar, com uma densidade máxima, nos biótopos peridomésticos, de 0,4 flebótomos/armadilha CDC/noite e 0,2 nos biótopos domésticos. Esta espécie foi a única que não foi capturada em biótopos silváticos durante o período de prospecção.

*S. minuta* apresentou a mesma densidade em biótopos peridomésticos e domésticos, com 0,6 flebótomos/armadilha CDC/noite, e uma densidade menor em biótopos silváticos, com 0,2 flebótomos/armadilha CDC/noite.

*P. ariasi*, contrariamente ao observado para as restantes espécies, apresentou a densidade máxima em biótopos domésticos, com 0,5 flebótomos/armadilha CDC/noite, seguindo-se os biótopos peridomésticos, com 0,3 flebótomos/armadilha CDC/noite e, por último, os silváticos, com 0,2 flebótomos/armadilha CDC/noite.

Através do teste de Kruskal-Wallis comparou-se a distribuição das densidades entre os vários tipos principais de biótopos, para as várias espécies flebotomínicas, verificando-se que a diferença apenas foi significativa para *P. perniciosus* ( $\chi^2$ :9,328, gl: 2,  $p=0,01$ ).



**Figura 45** - Densidades flebotomínicas (n° flebotomos/armadilha CDC/noite) por tipo principal de biótopo no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

### 3.5.1 - Biótopos domésticos

**Quadro 19** - Densidades flebotomínicas em biótopos domésticos, por espécie e por tipo de biótopo, capturados no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

Tipo de biótopo		Nº de CDC	Densidades flebotomínicas				Total
			<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>S. minuta</i>	
- sem animais	Casa- abandonada	3	0,33	0,33	0,00	0,33	1,00
	Casa- garagem	1	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00
	Casa- jardim	5	0,20	0,20	0,00	0,20	0,60
	Casa- quintal	15	0,47	0,07	0,07	0,20	0,80
	Casa- armazém lenha s/ animais	15	1,40	0,33	0,07	0,73	2,53
	Subtotal doméstico sem animais	39	0,79	0,21	0,05	0,41	1,46
+ com animais	Casa- armazém lenha c/ animais	7	4,14	0,86	1,00	2,43	8,43
	Casa/jardim /quintal com 1 ou mais cães e gatos	20	0,45	0,10	0,25	0,20	1,00
	Casa/jardim/quintal com 1 ou mais cães	19	1,79	1,68	0,11	0,53	4,11
	Casa/jardim/quintal com 1 ou mais gatos	5	0,40	0,20	0,00	0,60	1,20
	Subtotal doméstico com animais	51	1,45	0,80	0,27	0,67	3,20
Total doméstico		90	1,17	0,54	0,18	0,56	2,44

Para os biótopos domésticos (Quadro 19) verificou-se que as maiores densidades foram observadas quando existiam animais domésticos de livre circulação pelo biótopo

amostrado (3,2 flebótomos/armadilha CDC/noite vs 1,46 flebótomos/armadilha CDC/noite). A diferença não foi, no entanto, significativa pelo teste de Mann Whitney-U para qualquer uma das espécies flebotomínicas.

Em cada um dos subgrupos (com ou sem animais), as maiores densidades foram encontradas nos armazéns de lenha (8,43 e 2,53 flebótomos/armadilha CDC/noite, respectivamente). A diferença foi estatisticamente significativa para *P. perniciosus* ( $U=1062$ ,  $p=0,002$ ), quando comparando a distribuição de densidades em armazéns de lenha com os restantes biótopos domésticos. Para *P. ariasi* e *P. sergenti*, apenas comparando armazéns de lenha com animais com os restantes biótopos domésticos se verificaram diferenças significativas (*P. ariasi*,  $U=388$ ,  $p=0,046$ ; *P. sergenti*,  $U=436$ ,  $p<0,001$ ).

### 3.5.2 - Biótopos peridomésticos

**Quadro 20** - Densidades flebotomínicas em biótopos peridomésticos, por espécie e por tipo de biótopo, capturados no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

Tipo de biótopo		Nº de CDC	Densidades flebotomínicas				Total
			<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>S. minuta</i>	
simples	Canil	57	2,79	0,25	0,26	0,56	3,86
	Gaiola aves ornamentais	5	0,40	0,00	0,00	0,00	0,40
	Capoeira	46	1,83	0,33	0,59	0,26	3,00
	Pombal	2	1,00	0,50	0,00	0,00	1,50
	Pocilga	2	2,50	0,50	0,00	0,00	3,00
	Coelheira	3	1,67	0,00	1,33	0,00	3,00
	Curral cabras	4	5,75	0,00	0,50	0,75	7,00
	Curral cavalos	1	3,00	1,00	0,00	1,00	5,00
	Curral ovelhas	15	9,87	0,33	0,20	0,33	10,73
Subtotal simples		135	3,19	0,27	0,38	0,39	4,24
misto	Curral ovelhas + cabras	1	1,00	0,00	1,00	0,00	2,00
	Canil/coelheira	1	6,00	5,00	1,00	3,00	15,00
	Canil/pombal	1	4,00	0,00	0,00	1,00	5,00
	Capoeira/canil	5	1,40	0,20	0,20	0,20	2,00
	Capoeira/curral ovelhas	2	6,50	0,00	0,00	0,50	7,00
	Capoeira/curral ovelhas + cabras	3	2,67	0,67	0,00	0,00	3,33
	Coelheira/capoeira	4	1,00	0,00	0,50	1,25	2,75
	Coelheira/pocilga	3	18,33	0,67	3,00	1,00	23,00
	Coelheira/pombal/canil	4	2,75	0,25	0,50	0,00	3,50
	Curral cabras/ canil	1	14,00	0,00	0,00	1,00	15,00
	Curral ovelhas/canil	4	58,50	0,50	0,00	6,25	65,25
	Curral ovelhas/cavalos/pombal	1	5,00	0,00	0,00	0,00	5,00

Curral ovelhas/pocilga	1	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00
Subtotal misto	31	11,81	0,42	0,52	1,29	14,03
total peridoméstico	166	4,80	0,30	0,40	0,56	6,07

- Simples - apenas uma espécie de animal doméstico presente no abrigo

- Misto - mais do que uma espécie de animal doméstico no abrigo ou abrigos de várias espécies a menos de 2 m da armadilha CDC

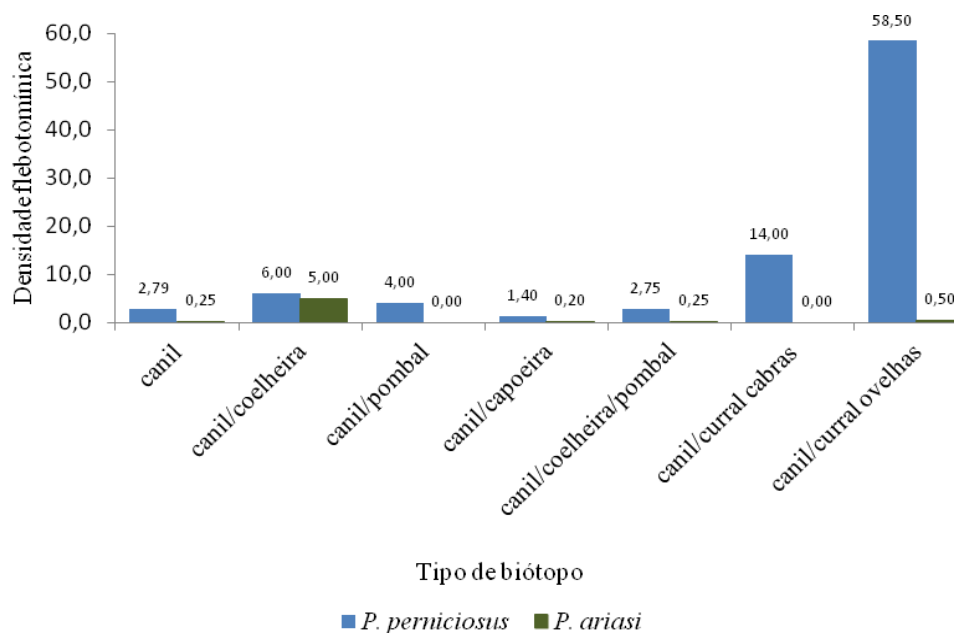
Para os biótopos peridomésticos (Quadro 20) verificou-se que as maiores densidades flebotomínicas se observaram em abrigos mistos (14,03 flebótomos/armadilha CDC/noite; 4,24 flebótomos/armadilha CDC/noite), sendo a diferença significativa para *P. perniciosus* ( $U=2224,5$ ,  $p=0,012$ ) e para *S. minuta* ( $U=2067,5$ ,  $p=0,026$ ).

*P. perniciosus* apresentou maior densidade em biótopos incluindo currais de ovelhas ( $U=2642,5$ ,  $p<0,001$ ), *P. sergenti* em biótopos incluindo coelheiras ( $U=1569$ ,  $p<0,001$ ) e para *P. ariasi* e *S. minuta* não foram detectadas diferenças significativas nas densidades quando comparando as diferentes espécies de animais domésticas abrigadas nos biótopos.

### 3.5.2.1 - Densidades de *P. perniciosus* e *P. ariasi* nos vários tipos de biótopos que incluem canis

Dado que os cães são o principal reservatório de *L. infantum* no país, analisou-se se existiam diferenças nas densidades flebotomínicas das duas espécies comprovadamente vectoras do parasita nos vários tipos de biótopos que incluem canis (Fig. 46).

Verificou-se que as densidades foram significativamente diferentes para *P. perniciosus* quando cães abrigados em conjunto com ovelhas ou a uma distância de menos de 2 metros do curral ( $U=185,5$ ,  $p=0,019$ ), sendo superiores quando na presença destas (58,50 flebótomos/armadilha CDC/noite para canil/curral ovelhas, e 2,79 flebótomos/armadilha CDC/noite para canil). Para *P. ariasi*, apesar da maior densidade observada para o biótopo do tipo “canil/coelheira” (5,0 flebótomos/armadilha CDC/noite), não se verificaram diferenças significativas nos vários casos.



**Figura 46** - Densidades (nº de flebotomos/armadilha CDC/noite) de *P. perniciosus* e *P. ariasi* em diferentes tipos de biótopo que incluem canis.

### 3.5.3 - Biótopos silváticos

**Quadro 21** - Densidades flebotomínicas em biótopos silváticos, por espécie e por tipo de biótopo, capturados no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

Tipo de biótopo	Nº de CDC	Densidades flebotomínicas				Total
		<i>P. perniciosus</i>	<i>P. ariasi</i>	<i>P. sergenti</i>	<i>S. minuta</i>	
Buraco em rocha	4	2,00	0,75	0,00	0,50	3,25
Canavial	1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Mato	12	1,67	0,08	0,00	0,08	1,83
Poço	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Total silvático	19	1,47	0,21	0,00	0,16	1,84

Nos biótopos silváticos (Quadro 21) apenas se capturaram flebotomos em buracos nas rochas e em mato. As densidades nestes dois tipos de biótopo foram semelhantes para as várias espécies flebotomínicas (teste de Mann Whitney - U,  $p > 0,05$ ).

### 3.6 - Factores de risco para a presença de flebótomos - Regressão logística

#### 3.6.1 - *Phlebotomus (Larrousius) perniciosus* Newstead, 1911

**Quadro 22** - Resultados da regressão logística simples para a presença de *P. perniciosus* no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010): IC 95% - Odds ratio e Intervalo de confiança a 95%, *p* - valor *p*, N - nº de biótopos (para as variáveis categóricas a categoria de referência-” indicador” está assinalada).

Variável	<i>P. perniciosus</i>					
	Presente		Ausente		Odds ratio (IC 95%)	<i>p</i>
	N=138	%	N=137	%		
Temperatura média I.M (N=275)					1,08 (1,01-1,15)	0,027
Humidade relativa média I.M (N=275)					0,98 (0,95-1,01)	0,137
Temperatura média medida no local (N=275)					1,07 (1,01-1,14)	0,021
Humidade relativa média medida no local (N=209)					0,97 (0,94-1,00)	0,041
Altitude ≥ 100m, (indicador <100m) (N=126)	64	46,4	62	45,3	1,04 (0,65-1,69)	0,852
Nível de vento (indicador 0)						0,004
1	58	42,0	51	37,2	0,94(0,56-1,55)	0,795
2	7	5,1	26	19	0,22(0,09-0,54)	0,001
Nível de abrigo (indicador 5)						0,003
0	11	8,0	26	19	0,14(0,04-0,54)	0,004
1	22	15,9	32	23,4	0,23(0,06-0,80)	0,021
2	23	16,7	31	22,6	0,25(0,07-0,87)	0,029
3	31	22,5	20	14,6	0,52(0,15-1,83)	0,306
4	39	28,3	24	17,5	0,54(0,16-1,88)	0,333
Tipo principal de biótopo (indicador doméstico)						0,102
silvático (N=19)	8	5,8	11	8,03	0,99(0,36-2,71)	0,993
peridoméstico (N=166)	92	66,7	74	54	1,70(1,01-2,86)	0,044
Animais domésticos num raio de 30m (indicador ausência)						
Cães (N=215)	108	78,3	107	78,1	1,01(0,57-1,79)	0,975
Gatos (N=111)	58	42,0	53	38,7	1,15(0,71-1,86)	0,572
Aves capoeira (N=144)	82	59,4	62	45,3	1,77(1,10-2,86)	0,019
Pombos (N=26)	15	10,9	11	8,03	1,40(0,62-3,16)	0,422
Coelhos (N=32)	22	15,9	10	7,3	2,41(1,10-5,30)	0,029
Bovinos (N=1)					Indefinido	
Ovelhas (N=69)	40	29,0	29	21,2	1,52(0,88-2,64)	0,136
Cabras (N=16)	12	8,7	4	2,92	3,17(0,99-10,08)	0,051
Cavalos (N=18)	13	9,4	5	3,65	2,75(0,95-7,92)	0,062
Porco (N=10)	8	5,8	2	1,46	4,15(0,87-19,93)	0,075
Aves ornamentais (N=17)	7	5,1	10	7,3	0,68(0,25-1,84)	0,446
Vegetação dominante (indicador ausência)						
Videira (N=30)	17	12,3	13	9,49	1,34(0,62-2,88)	0,453
Oliveira (N=145)	71	51,4	74	54	0,90(0,56-1,45)	0,670
Carvalho/Azinheira (N=29)	17	12,3	12	8,76	1,46(0,67-3,19)	0,339
Figueira (N=89)	52	37,7	37	27	1,63(0,98-2,72)	0,059

Pinheiro (N=37)	25	18,1	12	8,76	2,30(1,11-4,80)	0,026
Eucalipto (N=3)	2	1,4	1	0,73	2,00(0,18-22,32)	0,573
Fruteiras (N=166)	81	58,7	85	62	0,87(0,54-1,41)	0,570
Horta familiar (N=48)	22	15,9	26	19	0,81(0,43-1,51)	0,508
Cereais/Gramíneas (N=19)	8	5,8	11	8,03	0,70(0,27-1,81)	0,467
Plantas Ornamentais (N=68)	34	24,6	34	24,8	0,99(0,57-1,71)	0,972
Outra Vegetação (N=34)	13	9,4	21	15,3	0,57(0,28-1,20)	0,140
Tipo de Abrigo animal (indicador ausência)						
Canil (N=73)	32	23,2	41	29,9	0,71(0,41-1,21)	0,207
Capoeira (N=60)	35	25,4	25	18,2	1,52(0,85-2,72)	0,155
Pombal (N=8)	5	3,6	3	2,19	1,68(0,39-7,17)	0,484
Coelheira (N=15)	9	6,5	6	4,38	1,52(0,53-4,40)	0,437
Curral ovelhas (N=27)	20	14,5	7	5,11	3,15(1,28-7,71)	0,012
Curral cabras (N=9)	8	5,8	1	0,73	8,37(1,03-67,84)	0,047
Gaiola aves ornamentais (N=5)	2	1,4	3	2,19	0,66(0,11-3,99)	0,648
Pocilga (N=6)	5	3,6	1	0,73	5,11(0,59-44,35)	0,139
Curral cavalos (N=2)	2	1,4	0		Indefinido	
Ninhos com andorinhas a menos de 2m (N=22)	18	13,0	4	2,92	4,99(1,64-15,15)	0,005
Armazém lenha (indicador ausência) (N=22)	15	10,9	7	5,11	2,26(0,89-5,74)	0,085
Cães com substâncias repelentes (indicador ausência) (N=28)	13	9,4	15	10,9	0,85(0,39-1,85)	0,675

Na análise de regressão simples, as seguintes variáveis individuais apresentaram associação significativa com a presença de *P. perniciosus* (Quadro 22):

- Temperatura média, com a probabilidade da presença da espécie a aumentar com a temperatura, tanto com os dados fornecidos pelo I.M., como com os medidos no local (OR:1,08, IC95%:1,01-1,15,  $p=0,027$  e OR:1,07, IC95%:1,01-1,14,  $p=0,021$ , respectivamente).

- Humidade relativa média medida no local, com o risco de presença a diminuir com o aumento da humidade (OR:0,97, IC95%:0,94-1,00,  $p=0,041$ ).

- Nível de vento, com uma menor probabilidade da presença da espécie no caso de o vento ser forte (OR:0,22, IC95%:0,09-0,54,  $p=0,001$ ).

- Nível de abrigo, com maior risco de presença se o biótopo limitado por duas ou mais superfícies protectoras ( $p=0,003$ ).

- Tipo principal de biótopo, com maior risco de presença nos biótopos peridomésticos do que nos domésticos (OR:1,70, IC95%:1,01-2,86,  $p=0,044$ ).



- Maior risco de presença na ocorrência de aves de capoeira (OR:1,77, IC95%:1,10-2,86,  $p=0,019$ ) ou coelhos (OR:2,41, IC95%:1,10-5,30,  $p=0,029$ ) num raio de 30 metros da armadilha CDC.

- Maior risco de presença perante a existência de pinheiros, como vegetação dominante (OR: 2,30, IC95%:1,11-4,80,  $p=0,026$ ).

- Maior risco de presença em currais de ovelhas (OR:3,15, IC95%:1,28-7,71,  $p=0,012$ ), de cabras (OR:8,37, IC95%:1,03-67,84,  $p=0,047$ ) e quando a menos de 2m de ninhos com andorinhas (OR: 4,99, IC95%:1,64-15,15,  $p=0,005$ ), do que nos restantes tipos de biótopo.

**Quadro 23** - Resultados da regressão logística simples para a presença de *P. perniciosus* no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010): IC 95% - Odds ratio e Intervalo de confiança a 95%,  $p$  - valor  $p$  (para as variáveis categóricas a categoria de referência-” indicador” está assinalada).

Variável	<i>P. perniciosus</i>	
	Odds ratio (IC 95%)	$p$
Temperatura média I.M.	2,53 (1,74-3,70)	<0,001
Humidade relativa média I.M.	0,83 (0,74-0,98)	0,003
Nível de vento (indicador 0)		<0,001
1	0,59 (0,31-1,13)	0,114
2	0,07 (0,02-0,23)	<0,001
Nível de abrigo (indicador 5)		<0,001
0	0,04 (0,01-0,24)	<0,001
1	0,13 (0,02-0,60)	0,009
2	0,12 (0,02-0,55)	0,007
3	0,35 (0,07-1,67)	0,187
4	0,37 (0,08-1,69)	0,199
Tipo principal de biótopo (indicador doméstico)		0,032
silvático	2,31 (1,14-4,70)	0,053
peridoméstico	3,65 (1,01-13,58)	0,020
Animais domésticos num raio de 30m (indicador ausência)		
Aves capoeira	2,39 (1,24-4,61)	0,009
Vegetação dominante (indicador ausência)		
Pinheiro	3,77 (1,34-10,60)	0,012
Tipo de Abrigo animal (indicador ausência)		
Curral ovelhas	3,43 (1,02-13,97)	0,043
Ninhos com andorinhas a menos de 2m	14,51(2,70-78,18)	0,002

Após a realização da análise de regressão múltipla (Quadro 23), as variáveis temperatura (OR:2,53, IC95%:1,74-3,70,  $p<0,001$ ), nível de abrigo ( $p<0,001$ ), presença de aves de capoeira num raio de 30 metros da armadilha CDC (OR:2,39, IC95%:1,24-4,61,  $p=0,009$ ), pinheiro como vegetação dominante (OR:3,77, IC95%:1,34-10,60,  $p=0,012$ ), biótopo do tipo “curral de ovelhas” (OR:3,43, IC95%:1,02-13,97,  $p=0,043$ ) e presença de ninhos com andorinhas a menos de 2 metros da armadilha CDC (OR:14,51, IC95%:2,70-78,18,  $p=0,002$ ) mantiveram uma associação estatisticamente significativa, aumentando o risco de presença de *P. perniciosus*.

Entre os principais tipos de biótopo manteve-se a diferença estatística entre domésticos e peridomésticos, com maior risco de ocorrência da espécie nos últimos (OR:3,65, IC95%:1,01-13,59,  $p=0,020$ ).

O vento forte manteve o seu efeito negativo na probabilidade de presença da espécie (OR: 0,07, IC95%:0,02-0,23,  $p<0,001$ ).

Observou-se uma associação com a humidade relativa I.M., com o risco de presença da espécie, a diminuir com o aumento desta (OR:0,83, IC95%:0,74-0,98,  $p=0,003$ ).

A presença de coelhos num raio de 30 metros da armadilha CDC e biótopo do tipo “curral de cabras”, deixaram de apresentar associação significativa com a presença de *P. perniciosus*.

### 3.6.2 - *Phlebotomus (Larrousius) ariasi* Tonnoir, 1921

**Quadro 24** - Resultados da regressão logística simples para a presença de *P. ariasi* no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010): IC 95% - Odds ratio e Intervalo de confiança a 95%,  $p$  - valor  $p$ , N - nº de biótopos (para as variáveis categóricas a categoria de referência-” indicador” está assinalada).

Variável	<i>P. ariasi</i>					
	Presente		Ausente		<i>Odds ratio</i> (IC 95%)	<i>p</i>
	N=54	%	N=221	%		
Temperatura média I.M. (N=275)					1,02(0,94-1,11)	0,558
Humidade relativa média I.M. (N=275)					1,00(0,96-1,04)	0,881
Temperatura média medida no local (N=275)					1,04(0,97-1,12)	0,271
Humidade relativa média medida no local (N=209)					0,98(0,95-1,02)	0,341
Altitude ≥ 100m, (indicador <100m) (N=126)	19	35,2	107	48,4	0,58(0,31-1,07)	0,082
Nível de vento (indicador 0)						0,096

1	25	46,3	84	38,0	1,12(0,01-2,06)	0,725
2	1	1,9	32	14,5	0,12(0,02-0,90)	0,039
Nível de abrigo (indicador 5)						0,242
0	0	0,0	37	16,7	Indefinido	
1	2	3,7	14	6,3	1,04(0,19-5,60)	0,961
2	7	13,0	47	21,3	2,00(0,40-10,05)	0,400
3	12	22,2	42	19,0	2,40(0,48-11,98)	0,288
4	13	24,1	38	17,2	3,26(0,68-15,71)	0,142
Tipo principal de biótopo (indicador doméstico)						0,547
silvático (N=19)	3	5,6	16	7,2	0,62(0,16-2,32)	0,474
peridoméstico (N=166)	30	55,6	136	61,5	0,72(0,39-1,36)	0,315
Animais domésticos num raio de 30m (indicador ausência)						
Cães (N=215)	45	83,3	170	76,9	1,50(0,69-3,28)	0,309
Gatos (N=111)	21	38,9	90	40,7	0,93(0,50-1,70)	0,805
Aves capoeira (N=144)	27	50,0	117	52,9	0,89(0,49-1,61)	0,698
Pombos (N=26)	6	11,1	20	9,0	1,26(0,48-3,30)	0,643
Coelhos (N=32)	7	13,0	25	11,3	1,17(0,48-2,86)	0,735
Bovinos (N=1)					Indefinido	
Ovelhas (N=69)	13	24,1	56	25,3	0,93(0,47-1,87)	0,848
Cabras (N=16)	2	3,7	14	6,3	0,57(0,12-2,58)	0,465
Cavalos (N=18)	5	9,3	13	5,9	1,63(0,56-4,80)	0,372
Porco (N=10)	3	5,6	7	3,2	1,80(0,45-7,20)	0,407
Aves ornamentais (N=17)	1	1,9	16	7,2	0,24(0,03-1,86)	0,173
Vegetação dominante (indicador ausência)						
Videira (N=30)	7	13,0	23	10,4	1,28(0,52-3,17)	0,590
Oliveira (N=145)	23	42,6	122	55,2	0,60(0,33-1,10)	0,098
Carvalho/Azinheira (N=29)	6	11,1	23	10,4	1,08(0,42-2,79)	0,880
Figueira (N=89)	19	35,2	70	31,7	1,17(0,63-2,19)	0,621
Pinheiro (N=37)	13	24,1	24	10,9	2,60(1,22-5,53)	0,013
Eucalipto (N=3)	1	1,9	2	0,9	2,07(0,18-23,21)	0,557
Fruteiras (N=166)	36	66,7	130	58,8	1,40(0,75-2,62)	0,292
Horta familiar (N=48)	8	14,8	40	18,1	0,79(0,34-1,80)	0,569
Cereais/Gramíneas (N=19)	4	7,4	15	6,8	1,10(0,35-3,45)	0,872
Plantas Ornamentais (N=68)	17	31,5	51	23,1	1,53(0,80-2,94)	0,201
Outra Vegetação (N=34)	3	5,6	31	14,0	0,36(0,11-1,23)	0,103
Tipo de Abrigo animal (indicador ausência)						
Canil (N=73)	11	20,4	62	28,1	0,66(0,32-1,35)	0,254
Capoeira (N=60)	11	20,4	49	22,2	0,90(0,43-1,87)	0,774
Pombal (N=8)	2	3,7	6	2,7	1,38(0,27-7,02)	0,699
Coelheira (N=15)	4	7,4	11	5,0	1,53(0,47-5,00)	0,484
Curral ovelhas (N=27)	7	13,0	20	9,0	1,50(0,60-3,75)	0,389
Curral cabras (N=9)	1	1,9	8	3,6	0,50(0,06-4,10)	0,521
Gaiola aves ornamentais (N=5)	0	0,0	5	2,3	Indefinido	
Pocilga (N=6)	3	5,6	3	1,4	4,28(0,84-21,80)	0,081
Curral cavalos (N=2)	1	1,9	1	0,5	4,15(0,25-67,45)	0,317
Ninhos com andorinhas a menos de 2m (N=22)	11	20,4	11	5,0	4,88(1,99-11,99)	0,001
Armazém lenha (indicador ausência) (N=22)	8	14,8	14	6,3	2,57(1,02-6,49)	0,045

Cães com substâncias repelentes (indicador ausência) (N=28)	8	14,8	20	9,0	1,75(0,72-4,21)	0,214
--	---	------	----	-----	-----------------	-------

Para *P. ariasi*, através da análise de regressão simples (Quadro 24), verificou-se associação significativa, ao nível de significância de 5% com as seguintes variáveis:

- Nível de vento, com diminuição da probabilidade da presença da espécie se o vento forte (OR:0,12, IC95%:0,02-0,90,  $p=0,039$ ).

- Presença de pinheiros como vegetação dominante (OR:2,60, IC:1,22-5,53,  $p=0,013$ ).

- Presença de ninhos com andorinhas a menos de 2 metros da armadilha CDC (OR:4,88, IC95%:1,99-11,99,  $p=0,001$ ).

- Biótopo do tipo “armazém de lenha” (OR:2,57, IC:1,02-6,49,  $p=0,045$ ).

**Quadro 25** - Resultados da regressão logística simples para a presença de *P. ariasi* no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010): IC 95% - Odds ratio e Intervalo de confiança a 95%,  $p$  - valor  $p$  (para as variáveis categóricas a categoria de referência – “indicador” está assinalada).

Variável	<i>P. ariasi</i>	
	Odds ratio (IC 95%)	$p$
Temperatura média I.M.	1,08 (0,98-1,18)	0,118
Humidade relativa média I.M.	1,10 (0,97-1,26)	0,136
Nível de vento (indicador 0)		0,117
1	1,04 (0,54-2,02)	0,900
2	0,12 (0,01-0,94)	0,044
Vegetação dominante (indicador ausência)		
Pinheiro	2,44 (1,12-5,31)	0,025
Tipo de Abrigo animal (indicador ausência)		
Ninhos com andorinhas a menos de 2m	4,62 (1,86-11,51)	0,001
Armazém lenha	2,20(0,80-6,05)	0,129

Com a realização da análise de regressão múltipla (Quadro 25), o biótopo do tipo “armazém de lenha” deixa de estar significativamente associado à presença de *P. ariasi*. A presença de ninhos com andorinhas (OR:4,62, IC95%: 1,86-11,51,  $p=0,001$ ), pinheiro como vegetação dominante (OR:2,44, IC95%: 1,12-5,31,  $p=0,025$ ) e o vento forte (OR:0,12, IC95%:0,01-0,94,  $p=0,044$ ) mantém uma associação significativa,

aumentando o risco de ocorrência da espécie nos dois primeiros casos e diminuição no último.

### 3.6.3 - *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917

**Quadro 26** - Resultados da regressão logística simples para a presença de *P. sergenti* no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010): IC 95% - *Odds ratio* e Intervalo de confiança a 95%, *p* - valor *p*, N - nº de biótopos (para as variáveis categóricas a categoria de referência-” indicador” está assinalada).

Variável	P. sergenti					
	Presente		Ausente		Odds ratio	p
	N=41	%	N=234	%	(IC 95%)	
Temperatura média I.M. (N=275)					1,47(1,20-1,81)	<0,001
Humidade relativa média I.M. (N=275)					0,91(0,86-0,96)	0,001
Temperatura média medida no local (N=275)					1,17(0,97-1,12)	0,001
Humidade relativa média medida no local (N=209)					0,93(0,89-0,97)	0,001
Altitude ≥ 100m, (indicador <100m) (N=126)	16	39,0	110	47,0	0,72(0,37-1,42)	0,345
Nível de vento (indicador 0)		0,0		0,0		0,866
1	16	39,0	93	39,7	0,92(0,45-1,86)	0,811
2	4	9,8	29	12,4	0,74(0,23-2,31)	0,599
Nível de abrigo (indicador 5)						0,093
0	3	7,3	24	10,3	0,19(0,04-0,95)	0,043
1	4	9,8	50	21,4	0,18(0,04-0,76)	0,020
2	6	14,6	48	20,5	0,28(0,07-1,07)	0,062
3	10	24,4	41	17,5	0,54(0,15-1,90)	0,334
4	13	31,7	50	21,4	0,57(0,17-1,94)	0,370
Tipo principal de biótopo (indicador doméstico)						0,480
silvático (N=19)	0	0,0	19	8,1	indefinido	
peridoméstico (N=166)	30	73,2	136	58,1	1,58(0,75-3,34)	0,226
Animais domésticos num raio de 30m (indicador ausência)						
Cães (N=215)	33	80,5	182	77,8	1,18(0,51-2,71)	0,699
Gatos (N=111)	12	29,3	99	42,3	0,56(0,27-1,16)	0,120
Aves capoeira (N=144)	28	68,3	116	49,6	2,20(1,08-4,44)	0,029
Pombos (N=26)	7	17,1	19	8,1	2,33(0,91-5,96)	0,078
Coelhos (N=32)	11	26,8	21	9,0	3,72(1,63-8,47)	0,002
Bovinos (N=1)					Indefinido	
Ovelhas (N=69)	9	22,0	60	25,6	0,82(0,37-1,81)	0,616
Cabras (N=16)	3	7,3	13	5,6	1,34(0,36-4,93)	0,658
Cavalos (N=18)	3	7,3	15	6,4	1,15(0,32-4,17)	0,829
Porco (N=10)	5	12,2	5	2,1	6,36(1,75-23,07)	0,005
Aves ornamentais (N=17)	0	0,0	17	7,3	Indefinido	
Vegetação dominante (indicador ausência)						
Videira (N=30)	6	14,6	24	10,3	1,50(0,57-3,93)	0,409
Oliveira (N=145)	14	34,1	131	56,0	0,41(0,20-0,82)	0,011
Carvalho/Azinheira (N=29)	1	2,4	28	12,0	0,18(0,24-1,39)	0,101

Figueira (N=89)	10	24,4	79	33,8	0,63(0,30-1,36)	0,240
Pinheiro (N=37)	8	19,5	29	12,4	1,71(0,72-4,07)	0,222
Eucalipto (N=3)	0	0,0	3	1,3	Indefinido	
Fruteiras (N=166)	27	65,9	139	59,4	1,32(0,66-2,64)	0,437
Horta familiar (N=48)	11	26,8	37	15,8	1,95(0,90-4,24)	0,091
Cereais/Gramíneas (N=19)	5	12,2	14	6,0	2,18(0,74-6,43)	0,157
Plantas Ornamentais (N=68)	8	19,5	60	25,6	0,70(0,31-1,61)	0,403
Outra Vegetação (N=34)	5	12,2	29	12,4	0,98(0,36-2,70)	0,972
Tipo de Abrigo animal (indicador ausência)						
Canil (N=73)	8	19,5	65	27,8	0,63(0,28-1,44)	0,272
Capoeira (N=60)	14	34,1	46	19,7	2,12(1,03-4,36)	0,041
Pombal (N=8)	1	2,4	7	3,0	0,81(0,10-6,77)	0,846
Coelheira (N=15)	8	19,5	7	3,0	7,86(2,68-23,10)	<0,001
Curral ovelhas (N=27)	3	7,3	24	10,3	0,69(0,20-2,41)	0,562
Curral cabras (N=9)	3	7,3	6	2,6	3,00(0,72-12,51)	0,132
Gaiola aves ornamentais (N=5)	0	0,0	5	2,1	Indefinido	
Pocilga (N=6)	2	4,9	4	1,7	2,95(0,52-16,65)	0,221
Curral cavalos (N=2)	0	0,0	2	0,9	Indefinido	
Ninhos com andorinhas a menos de 2m (N=22)	7	17,1	15	6,4	3,01(1,14-7,90)	0,026
Armazém lenha (indicador ausência) (N=22)	5	12,2	17	7,3	1,77(0,62-5,10)	0,289
Cães com substâncias repelentes (indicador ausência) (N=28)	3	7,3	25	10,7	0,66(0,19-2,30)	0,514

Para *P. sergenti* (Quadro 26) com a análise de regressão simples verificou-se um efeito positivo da temperatura, tanto com os dados fornecidos pelo Instituto de Meteorologia, I.P., Portugal (OR:1,47, IC95%:1,20-1,81,  $p<0,001$ ), como com os medidos no local de captura (OR:1,17, IC95%:0,97-1,12,  $p=0,001$ ) na probabilidade de ocorrência da espécie e um efeito negativo da humidade relativa média (também com ambas as fontes de dados, OR:0,91, IC95%:0,86-0,96,  $p=0,001$  e OR:0,93, IC95%:0,89-0,97,  $p=0,001$ , respectivamente) nesta probabilidade.

O nível de abrigo apresentou também resultados significativamente diferentes, com uma menor probabilidade da presença da espécie no caso de o nível de abrigo ser inferior ou igual a uma superfície protectora (OR: 0,19, IC95%:0,04-0,95,  $p=0,043$ , para ausência de superfícies protectoras e OR:0,18, IC95%:0,04-0,76,  $p=0,020$ , para uma superfície protectora).

Das várias espécies de animais domésticos presentes num raio de 30 metros, verificou-se que as aves de capoeira (OR:2,20, IC95%:1,08-4,44,  $p=0,029$ ), os coelhos

(OR:3,72, IC95%:1,63-8,47,  $p=0,002$ ) e os suínos (OR: 6,36, IC95%:1,75-23,07,  $p=0,005$ ), exerceram um efeito positivo na probabilidade de ocorrência de *P. sergenti*.

A presença de oliveira reduziu o risco de encontrar a espécie (OR:0,41, IC95%:0,20-0,82,  $p=0,011$ ).

Por fim, os biótopos do tipo “capoeira” (OR:2,12, IC95%:1,03-4,36,  $p=0,041$ ), “coelheira” (OR:7,86, IC95%:2,68-23,10,  $p<0,001$ ), ou com presença de ninhos com andorinhas (OR:3,01, IC95%:1,14-7,90,  $p=0,026$ ), apresentaram maior probabilidade de presença de *P. sergenti*.

**Quadro 27** - Resultados da regressão logística simples para a presença de *P. sergenti* no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010): IC 95% - Odds ratio e Intervalo de confiança a 95%,  $p$  - valor  $p$  (para as variáveis categóricas a categoria de referência-” indicador” está assinalada).

Variável	<i>P. sergenti</i>	
	Odds ratio (IC 95%)	$p$
Temperatura média I.M.	5,92 (2,59-13,53)	<0,001
Humidade relativa média I.M.	0,65 (0,50-0,84)	0,001
Nível de abrigo (indicador 5)		0,051
0	0,30 (0,03-3,13)	0,315
1	0,19 (0,02-1,75)	0,143
2	0,24 (0,03-2,05)	0,194
3	1,38 (0,18-10,49)	0,759
4	1,00(0,14-6,99)	1.000
Animais domésticos num raio de 30m (indicador ausência)		
Aves capoeira	3,18 (1,16-8,69)	0,024
Coelhos	0,71 (0,13-3,80)	0,693
Porcos	3,60 (0,64-20,44)	0,148
Vegetação dominante (indicador ausência)		
Oliveira	0,28 (0,11-0,70)	0,006
Tipo de Abrigo animal (indicador ausência)		
Capoeira	1,72 (0,60-4,97)	0,313
Coelheira	14,73 (2,30-94,47)	0,005
Ninhos com andorinhas a menos de 2m	10,61 (2,53-44,53)	0,001

Com a análise de regressão múltipla para *P. sergenti* (Quadro 27), a temperatura média (OR:5,92, IC95%:2,59-13,53,  $p<0,001$ ), a presença de aves de capoeira (OR:3,18, IC95%:1,16-8,69,  $p=0,024$ ) num raio de 30m da armadilha CDC e os biótopos do tipo “coelheira” (OR:14,73, IC95%:2,30-94,47,  $p=0,005$ ) ou com presença

de ninhos com andorinhas (OR:10,61, IC95%:2,53-44,53,  $p=0,001$ ) mantiveram uma associação positiva com a probabilidade de presença desta espécie flebotomínica, enquanto a presença de oliveira (OR:0,28, IC95%:0,11-0,70,  $p=0,006$ ), bem como a humidade relativa média I.M. (OR:0,65, IC95%:0,50-0,84,  $p=0,001$ ) mantiveram uma associação negativa.

As variáveis, nível de abrigo, presença de coelhos e porcos num raio de 30 metros da armadilha CDC e o biótopo do tipo “capoeira” deixaram de apresentar associação estatisticamente significativa com o risco de ocorrência da espécie.

### 3.6.4 - *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta* (Rondani, 1843)

**Quadro 28** - Resultados da regressão logística simples para a presença de *S. minuta* no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010): IC 95% - Odds ratio e Intervalo de confiança a 95%,  $p$  - valor  $p$ , N - nº de biótopos (para as variáveis categóricas a categoria de referência-” indicador” está assinalada).

Variável	S. minuta					
	Presente		Ausente		Odds ratio	p
	N=64	%	211	%	(IC 95%)	
Temperatura média I.M. (N=275)					1,16(1,05-1,29)	0,005
Humidade relativa média I.M. (N=275)					0,93(0,90-0,97)	0,001
Temperatura média medida no local (N=275)					1,12(1,04-1,21)	0,003
Humidade relativa média medida no local (N=209)					0,96(0,92-0,99)	0,006
Altitude ≥ 100m, (indicador < 100m) (N=126)	28	43,8	98	46,4	0,90(0,51-1,57)	0,705
Nível de vento (indicador 0)						0,193
1	30	46,9	79	37,4	1,30(0,73-2,34)	0,374
2	4	6,3	29	13,7	0,47(0,15-1,45)	0,192
Nível de abrigo (indicador 5)						0,406
0	4	6,3	33	15,6	0,20(0,05-0,86)	0,031
1	12	18,8	42	19,9	0,48(0,14-1,58)	0,225
2	14	21,9	40	19,0	0,58(0,18-1,90)	0,371
3	13	20,3	38	18,0	0,57(0,17-1,88)	0,356
4	15	23,4	48	22,7	0,52(0,16-1,67)	0,273
Tipo principal de biótopo (indicador doméstico)						0,422
silvático (N=19)	2	3,1	17	8,1	0,36(0,08-1,70)	0,199
peridoméstico (N=166)	40	62,5	126	59,7	0,98(0,54-1,78)	0,951
Animais domésticos num raio de 30m (indicador ausência)						
Cães (N=215)	54	84,4	161	76,3	1,68 (0,80-3,53)	0,174
Gatos (N=111)	36	56,3	75	35,5	2,33 (1,32-4,12)	0,004
Aves capoeira (N=144)	36	56,3	108	51,2	1,23 (0,70-2,15)	0,478
Pombos (N=26)	5	7,8	21	10,0	0,77(0,28-2,12)	0,609



Coelhos (N=32)	11	17,2	21	10,0	1,88(0,85-4,14)	0,118
Bovinos (N=1)			Indefinido			
Ovelhas (N=69)	27	42,2	42	19,9	2,94(1,61-5,35)	<0,001
Cabras (N=16)	5	7,8	11	5,2	1,54(0,52-4,61)	0,440
Cavalos (N=18)	3	4,7	15	7,1	0,64(0,18-2,29)	0,496
Porco (N=10)	3	4,7	7	3,3	1,43(0,36-5,71)	0,610
Aves ornamentais (N=17)	2	3,1	15	7,1	0,42(0,09-1,89)	0,260
Vegetação dominante (indicador ausência)						
Videira (N=30)	11	17,2	19	9,0	2,10(0,94-4,68)	0,070
Oliveira (N=145)	35	54,7	110	52,1	1,11(0,63-1,94)	0,720
Carvalho/Azinheira (N=29)	6	9,4	23	10,9	0,85(0,33-2,18)	0,728
Figueira (N=89)	27	42,2	62	29,4	1,75(0,98-3,12)	0,057
Pinheiro (N=37)	7	10,9	30	14,2	0,74(0,31-1,78)	0,502
Eucalipto (N=3)	1	1,6	2	0,9	1,66(0,15-18,60)	0,682
Fruteiras (N=166)	38	59,4	128	60,7	0,95(0,54-1,68)	0,854
Horta familiar (N=48)	14	21,9	34	16,1	1,46(0,73-2,93)	0,289
Cereais/Gramíneas (N=19)	4	6,3	15	7,1	0,87(0,28-2,72)	0,813
Plantas Ornamentais (N=68)	13	20,3	55	26,1	0,72(0,37-1,43)	0,351
Outra Vegetação (N=34)	5	7,8	29	13,7	0,53(0,20-1,44)	0,213
Tipo de Abrigo animal (indicador ausência)						
Canil (N=73)	20	31,3	53	25,1	1,36(0,73-2,50)	0,332
Capoeira (N=60)	13	20,3	47	22,3	0,89(0,45-1,77)	0,739
Pombal (N=8)	1	1,6	7	3,3	0,46(0,06-3,83)	0,475
Coelheira (N=15)	6	9,4	9	4,3	2,32(0,79-6,79)	0,124
Curral ovelhas (N=27)	7	10,9	20	9,5	1,17(0,47-2,91)	0,731
Curral cabras (N=9)	3	4,7	6	2,8	1,62(0,41-6,92)	0,472
Gaiola aves ornamentais (N=5)	0	0,0	5	2,4	Indefinido	
Pocilga (N=6)	2	3,1	4	1,9	1,67(0,30-9,33)	0,559
Curral cavalos (N=2)	1	1,6	1	0,5	3,33(0,21-54,06)	0,397
Ninhos com andorinhas a menos de 2m (N=22)	11	17,2	11	5,2	3,77(1,55-9,18)	0,003
Armazém lenha (indicador ausência) (N=22)	8	12,5	14	6,6	2,01(0,80-5,03)	0,136
Cães com substâncias repelentes (indicador ausência) (N=28)	7	10,9	21	10,0	1,11(0,45-2,75)	0,820

De acordo com os resultados da análise de regressão simples, *S. minuta* apresentou associação significativa com as seguintes variáveis (Quadro 28):

- Temperatura média, tanto com os dados fornecidos pelo Instituto de Meteorologia, I.P., Portugal (OR: 1,16, IC95%:1,05-1,29,  $p=0,005$ ), como com os medidos no local de captura (OR: 1,12, IC95%:1,04-1,21,  $p=0,003$ ), aumentando a probabilidade de ocorrência da espécie.

- Humidade relativa média (também com ambas as fontes de dados (OR: 0,93, IC95%:0,89-0,97,  $p=0,001$  e OR:0,96, IC95%:0,92-0,99,  $p=0,006$ , respectivamente), com a probabilidade de ocorrência de *S. minuta* a diminuir com a mesma.

- Influência positiva da presença de gatos (OR: 2,33, IC95%:1,32-4,12,  $p=0,004$ ), ou de ovelhas (OR: 2,94, IC95%:1,61-5,35,  $p<0,001$ ) num raio de 30m da armadilha CDC, e de ninhos de andorinha nos biótopos de captura (OR:3,77, IC95%:1,55-9,18,  $p=0,003$ ).

**Quadro 29** - Resultados da regressão logística simples para a presença de *S. minuta* no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010): IC 95% - Odds ratio e Intervalo de confiança a 95%,  $p$  - valor  $p$  (para as variáveis categóricas a categoria de referência-” indicador” está assinalada).

Variável	<i>S. minuta</i>	
	Odds ratio (IC 95%)	$p$
Temperatura média I.M.	1,22 (1,10-1,36)	<0,001
Humidade relativa média I.M.	0,96 (0,84-1,09)	0,510
Animais domésticos num raio de 30m (indicador ausência)		
Gatos	2,56 (1,28-5,09)	0,008
Ovelhas	2,83 (1,41-5,68)	0,003
Tipo de Abrigo animal (indicador ausência)		
Ninhos com andorinhas a menos de 2m	11,54 (3,75-35,49)	<0,001

Com a análise de regressão múltipla (Quadro 29), a temperatura média I.M. (OR: 1,22, IC95%:1,10-1,36,  $p<0,001$ ), a presença de gatos (OR:2,56, IC:1,28-5,09,  $p=0,008$ ) ou ovelhas (OR:2,83, IC95%:1,41-5,68,  $p=0,003$ ) num raio de 30 metros da armadilha CDC e a presença de ninhos com andorinhas (OR:11,54, IC95%:3,75-35,49,  $p<0,001$ ) mantém uma associação significativa, aumentando a probabilidade de ocorrência de *S. minuta*.

A humidade relativa média I.M. deixa de ter influência no risco de presença da espécie.

### 3.6.5 - Factores de variação nas densidades, em relação aos biótopos positivos para flebótomos

Para as variáveis testadas na análise de regressão logística simples, realizaram-se testes não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis) para comparação de densidades, mas incluindo apenas os biótopos positivos para cada espécie flebotomínica.

Observaram-se diferenças significativas na distribuição das densidades com as seguintes variáveis:

#### Para *P. perniciosus*

- Maiores densidades com a presença de: oliveiras (9,6 vs 3,7 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:2978,  $p=0,009$ ); carvalhos/azinheiras (9,6 vs 6,3 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:1336,  $p=0,041$ ); pinheiros (9,7 vs 6,1 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:1838,  $p=0,016$ ); canis (13,6 vs 4,7 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:2104,  $p=0,035$ ); currais de ovelhas (20,7 vs 4,4 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:1833,  $p<0,001$ ); presença de ovelhas (15,7 vs 3,1 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:2878,  $p<0,001$ ) ou cabras (27,4 vs 4,8 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:1164,  $p=0,002$ ) num raio de 30 metros da armadilha CDC.

- Tipo principal de biótopo ( $\chi^2:9,5$ , gl:2,  $p=0,009$ ), com maiores densidades em biótopos peridomésticos, do que nos domésticos (8,7 vs 2,8 flebótomos/armadilha CDC/noite), mas sem diferença de ambos com os silváticos (3,5 flebótomos/armadilha CDC/noite).

- Menores densidades com a presença de árvores de fruto (4,2 vs 10,4 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:1744,  $p=0,013$ ) e de plantas ornamentais (2,5 vs 10,4 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:1117,  $p=0,001$ ).

#### Para *P. ariasi*

- Maiores densidades com a presença de: cães com substâncias repelentes (3,5 vs 1,6 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:266,  $p=0,023$ ) e com a presença de ninhos com

andorinhas a menos de 2 metros da armadilha CDC (3,4 vs 1,53 flebótomos/armadilha CDC/noite, U:339,  $p=0,012$ ).

Para *P. sergenti* e *S. minuta*

- Nenhuma variável teve efeito significativo sobre a distribuição das densidades.

### 3.7 - Associação de espécies

#### 3.7.1 - Associação entre as várias espécies flebotomínicas

**Quadro 30** - Número de biótopos positivos para cada uma das espécies flebotomínicas assinaladas no Concelho de Torres Novas e respectivo resultado do teste de associação de Spearman (Junho a Novembro, 2010). N - nº de biótopos positivos,  $r_s$  - coeficiente de Spearman,  $p$  - valor  $p$ .

Espécie flebotomínica	<i>P. perniciosus</i>			<i>P. ariasi</i>			<i>P. sergenti</i>			<i>S. minuta</i>		
	N	$r_s$	$p$	N	$r_s$	$p$	N	$r_s$	$p$	N	$r_s$	$p$
<i>P. perniciosus</i>	138	(1,00)	--	49	0,45	0,000	32	0,27	0,000	47	0,32	0,000
<i>P. ariasi</i>				54	(1,00)	--	15	0,18	0,003	23	0,25	0,000
<i>P. sergenti</i>							41	(1,00)	--	13	0,10	0,088
<i>S. minuta</i>										64	(1,00)	--

No Quadro 30, podem ser observados o número de biótopos em que as várias espécies foram capturadas em conjunto e os resultados do coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ). Ao nível de significância de 5%, verificou-se uma associação positiva entre todas as espécies flebotomínicas à excepção de *P. sergenti* e *S. minuta* ( $r_s:0,10$ ,  $p=0,088$ ). A associação teve o seu valor mais elevado entre as espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi* ( $r_s:0,45$ ,  $p<0,001$ ).

#### 3.7.2 - Associação entre as diferentes espécies de vertebrados domésticos e as várias espécies flebotomínicas

A associação das várias espécies flebotomínicas com as diferentes espécies de vertebrados domésticos (em número), presentes num raio de 30 metros da armadilha CDC, foi analisada também através do teste de Spearman tendo-se obtido correlações significativas nos seguintes casos:

- Abundância de *P. perniciosus* positivamente associada ao número de aves de capoeira ( $r_s:0,20$ ,  $p=0,001$ ), coelhos ( $r_s:0,17$ ,  $p=0,005$ ), ovelhas ( $r_s:0,21$ ,  $p<0,001$ ), cabras ( $r_s:0,20$ ,  $p=0,001$ ) e cavalos ( $r_s:0,16$ ,  $p=0,007$ ).

- Abundância de *P. sergenti* positivamente associada ao número de coelhos ( $r_s:0,18$ ,  $p=0,002$ ).

- Abundância de *S. minuta* positivamente associada ao número de gatos ( $r_s:0,17$ ,  $p=0,006$ ) e de ovelhas ( $r_s:0,21$ ,  $p=0,001$ ).

- Para *P. ariasi* não se observou associação significativa com nenhuma das espécies de vertebrados domésticos.

### 3.8 - Análise molecular

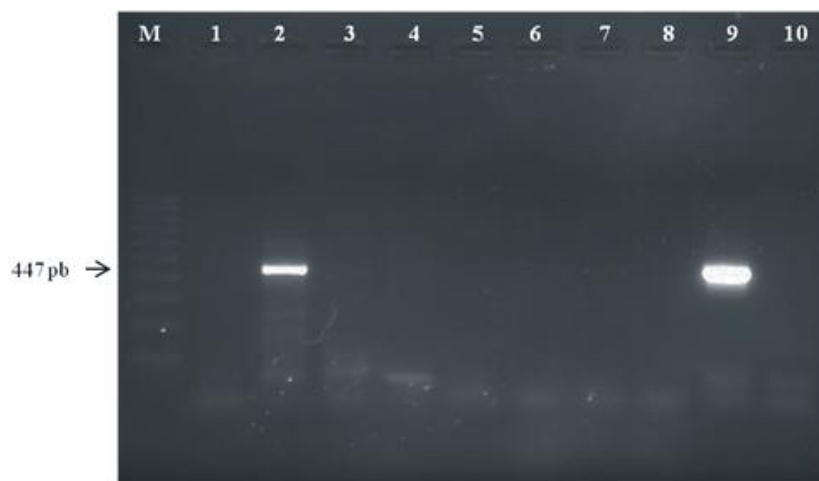
#### 3.8.1 - Taxa de infecção flebotomínica por *Leishmania* sp.

Ao visualizar-se em gel de agarose o produto amplificado por “PCR” com os primers MC1/ MC2 (Fig. 47), observou-se para a amostra número 6 (fêmea de *P. ariasi*, grávida), uma banda de 447 pb, resultante da amplificação do DNA cinetoplastideal de *L. infantum*.

O DNA desta amostra foi amplificado com os “primers” LITSR / L5.8S para amplificação do ITS1 do operão ribossomal (Fig. 48) e visualizou-se uma banda de 314 pb, característica de *L. infantum*.

Ao realizar-se a restrição enzimática do produto de ITS1-PCR com a enzima HaeIII, não se obtiveram as bandas de restrição esperadas com o volume de amostra de DNA indicado no ponto 2.7.2.2 (2 µl). Aumentando o volume inicial de amostra para 10 µl foi possível a visualização das três bandas resultantes, de 184pb, 72 pb e 54 pb (as bandas de menores dimensões muito ténues), alinhadas com as bandas de restrição da amostra de controlo, DNA proveniente de uma cultura de *L. infantum*.

Com a análise do resultado da sequenciação do produto amplificado com os “primers” MC1/MC2, obteve-se 95% de homologia com as estirpes de *L. infantum* registadas no GenBank.



**Figura 47** - Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR com as sequências iniciadoras MC1/ MC2: Linha 1 - controlo negativo (sem DNA); Linha 2 - controlo positivo (amostra de DNA de *L. infantum*); Linhas 4 a 9 - amostras de DNA extraído de fêmeas de *P. perniciosus* e *P. ariasi*, a linha 9 corresponde a DNA de uma fêmea de *P. ariasi* infectada com *L. infantum*; M - marcador de massa molecular de 100 pb (fotografia de Sofia Branco, 2011).



**Figura 48** - Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR com as sequências iniciadoras LITSR / L5.8S (Linhas 1 a 3, à esquerda) e restrição enzimática com a endonuclease HaeIII (Linhas 6 a 8, à direita). À esquerda: Linha 1- controlo positivo (amostra de DNA de *L. infantum*); Linha 2 - controlo negativo (sem DNA); Linha 3 - amostra de DNA número 6, extraído de uma fêmea de *P. ariasi*; À direita: Linha 6 - controlo positivo (amostra de DNA de *L. infantum*); Linha 7 - controlo negativo (sem DNA); Linha 8 - amostra de DNA número 6, extraído de uma fêmea de *P. ariasi*; M - marcador de massa molecular de 50 pb (fotografia de Sofia Branco, 2011).

Para todas as restantes amostras de DNA, não se obteve amplificação com nenhum dos pares de sequências iniciadoras, ou seja, os resultados foram negativos. Assim, no total das 315 fêmeas analisadas, apenas foi detectada uma fêmea de *P. ariasi* infectada com *L. infantum*.

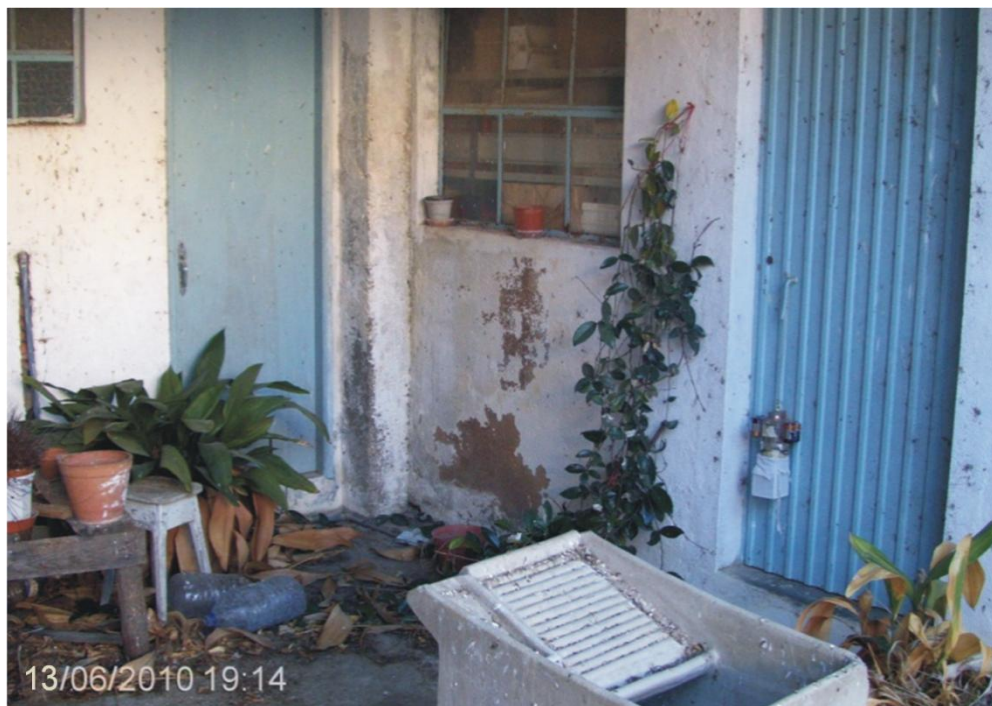
**Quadro 31** - Taxa de infecção por *L. infantum* das fêmeas flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

Espécie flebotomínica	Fêmeas		
	Infectadas com <i>L. infantum</i>	Total	Taxa de infecção por <i>L. infantum</i> (%)
<i>P. (Larroussius) perniciosus</i>	0	184	0,00
<i>P. (Larroussius) ariasi</i>	1	25	4,00
Subtotal <i>Larroussius</i>	1	209	0,48
<i>P. (Paraphlebotomus) sergenti</i>	0	39	0,00
<i>S. (Sergentomyia) minuta</i>	0	67	0,00
Total	1	315	0,32

A taxa de infecção (Quadro 31) por *L. infantum* das fêmeas capturadas no Concelho durante o período de prospecção (Junho a Novembro, 2010) foi de 4% (1/25) para *P. ariasi*, 0,48% (1/209) para as espécies do Subgénero *Larroussius* e 0,32% (1/315) para o total de fêmeas das várias espécies flebotomínicas.

A fêmea infectada foi capturada a 13 de Junho de 2010. A taxa de infecção neste mês foi de 14,29% (1/7) para *P. ariasi*, 5,88% (1/17) para as espécies do Subgénero *Larroussius*, e 4,54% (1/22) para o total de fêmeas flebotomínicas das várias espécies. Para os restantes meses de amostragem a taxa de infecção foi zero para todas as espécies.

A captura da fêmea infectada efectuou-se num biótopo do tipo “Casa – quintal com cães” na localidade de Adofreire, freguesia de Pedrogão (Fig. 49). Um dos cães presentes à data de captura, ao qual foi diagnosticado leishmaniose por um médico veterinário (o método de diagnóstico não foi especificado), faleceu em Agosto do mesmo ano. O biótopo apresentava grande quantidade de ninhos de andorinhas e fez das mesmas, nas paredes e chão da habitação.



**Figura 49** - Biótopo onde foi capturada a fêmea de *P. ariasi* infectada por *L. infantum*  
(fotografia de Sofia Branco, 2010)

### 3.8.2 - Identificação das refeições sanguíneas

Das 315 fêmeas capturadas, 42 apresentavam-se ingurgitadas (com sangue no abdómen): 27 *P. perniciosus*, 4 *P. ariasi*, 9 *P. sergenti* e 2 *S. minuta*.

Destas 42 fêmeas alimentadas, apenas se verificou amplificação por PCR do segmento de cerca de 350 pb do gene “Cit b” de vertebrados (Fig. 50), em 28 fêmeas, 18 *P. perniciosus*, 2 *P. ariasi*, 7 *P. sergenti* e 1 *S. minuta*. A identificação da fonte alimentar foi realizada em 18 fêmeas (Quadro 32).





**Figura 50** - Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR com as sequências iniciadoras CytB1-F/CytB2-R, de um segmento do gene “Cit b” de vertebrados: Linha 1 - controle positivo (amostra de DNA humano); Linhas 3/5/7/9/11/13/15/17/19 - amostras de fêmeas flebotômicas ingurgitadas com sangue; M - marcador molecular de 100 pb (fotografia de Sofia Branco, 2011).

Por análise comparativa das sequências do Genbank, com as sequências nucleotídicas do segmento do gene “Cit b” amplificadas, identificaram-se os seguintes vertebrados como fonte de alimentação sanguínea:

- Em relação à espécie *P. perniciosus* detectou-se uma fêmea alimentada em humano (5,56% - *Homo sapiens*, 76% de homologia), quatro fêmeas em ovinos (22,22% - *Ovis aries*, cerca de 95% de homologia), duas em caprinos (11,11% - *Capra hircus*, cerca de 95% de homologia), uma em bovino (5,56% - *Bos taurus*, 77% de homologia), uma em coelho (5,56% - *Oryctolagus cuniculus*, 95% de homologia), uma em galináceo (5,56% *Galus galus*, 99% de homologia), uma em morcego (5,56% - *Eptesicus*, 75% de homologia), quatro em roedores marsupiais (22,22% - *Marmosa murina*, cerca de 80% de homologia). Para três fêmeas (16,66%) não foi detectada homologia da sequência nucleotídica no GenBank.

- Em *P. ariasi* foi detectada uma fêmea alimentada num galináceo (*Galus galus*, 99% de homologia), e, para a outra fêmea em que se verificou amplificação do gene Cit b, não foi identificada a fonte sanguínea (devido à qualidade do DNA isolado).

- Em *P. sergenti*, foi identificada a fonte da refeição sanguínea de duas fêmeas, uma alimentada em *Homo sapiens* (100% de homologia) e a outra em galináceo (97% de homologia com as estirpes de *Galus galus* presentes no GenBank). Nas restantes fêmeas, em quatro a qualidade do DNA isolado não permitiu a análise sequencial e na quinta não foi detectada homologia com as sequências existentes no GenBank.

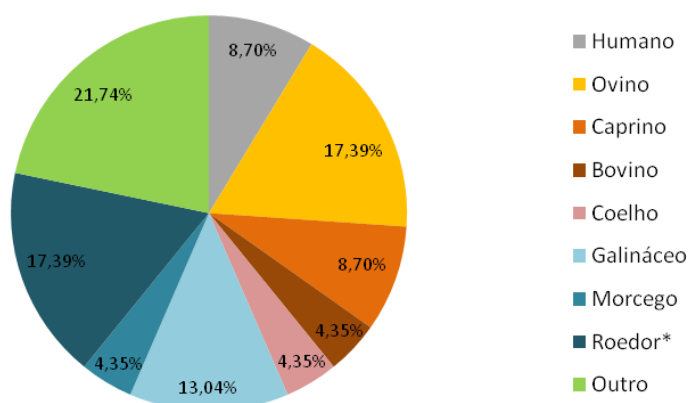
- Para *S. minuta* não foi encontrada homologia no GenBank para a amostra analisada.

As sequências cuja qualidade não permitiu realizar a comparação com sequências do GenBank, não foram incluídas no cálculo das percentagens.

**Quadro 32** - Identificação da fonte das refeições sanguíneas das fêmeas flebotômicas capturadas no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010), por análise da sequência obtida após amplificação de um segmento do gene “Cit b”.

Espécie flebotômica	Tipo de vertebrado em que foram efectuadas as refeições sanguíneas								
	Humano	Ovino	Caprino	Bovino	Coelho	Galináceo	Morcego	Roedor*	Outro
<i>P. perniciosus</i>	1	4	2	1	1	1	1	4	3
<i>P. ariasi</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>P. sergenti</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>S. minuta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total	2	4	2	1	1	3	1	4	5

\*marsupial



**Figura 51** - Proporção (%) das diferentes fontes sanguíneas das fêmeas flebotômicas capturadas no Concelho de Torres Novas (Junho a Novembro, 2010).

Das 18 fêmeas para as quais foi possível identificar a fonte da refeição sanguínea, 88,9% (16/18) foram capturadas em biótopos peridomésticos e as restantes (11,1%, 2/18) em biótopos silváticos (Quadro 33).

**Quadro 33** - Espécies flebotomínicas, tipo e espécies de vertebrado em que se alimentaram, tipo de biótopo e animais domésticos presentes num raio de 30 m da armadilha CDC (Junho a Novembro, 2010).

<b>Espécie flebotomínica</b>	<b>Fonte alimentar</b>	<b>Tipo de biótopo onde a fêmea flebotomínica foi capturada</b>	<b>Animais domésticos presentes num raio de 30m</b>
<i>P. perniciosus</i>	Humano ( <i>Homo sapiens</i> )	mato	Ausentes
<i>P. perniciosus</i>	Ovino ( <i>Ovis aries</i> )	curral ovelhas/canil	Ovelhas, cães, gatos, pombos
<i>P. perniciosus</i>	Ovino ( <i>O. aries</i> , <i>O. orientalis</i> )	curral ovelhas	Ovelhas, gatos, aves capoeira, cavalos
<i>P. perniciosus</i>	Ovino ( <i>O. aries</i> )	curral ovelhas	Ovelhas, gatos, aves capoeira, cavalos
<i>P. perniciosus</i>	Ovino ( <i>O. aries</i> )	curral ovelhas	Ovelhas, gatos, aves capoeira, cavalos
<i>P. perniciosus</i>	Caprino ( <i>Capra hircus</i> )	capoeira/curral ovelhas e cabras	Cabras, ovelhas, cães, aves capoeira
<i>P. perniciosus</i>	Caprino ( <i>C. hircus</i> )	curral cabras/canil	Cães, gatos, aves capoeira, ovelhas, cabras
<i>P. perniciosus</i>	Bovino ( <i>Bos taurus</i> )	capoeira	Cães, aves capoeira
<i>P. perniciosus</i>	Coelho ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	canil	Coelhos, cães, aves capoeira
<i>P. perniciosus</i>	Galináceo ( <i>Galus galus</i> )	capoeira	Aves capoeira, cães
<i>P. perniciosus</i>	Morcego ( <i>Eptesicus</i> )	mato	Ausentes
<i>P. perniciosus</i>	Roedor marsupial ( <i>Marmosa murina</i> )	curral cavalos	Cães, cavalos
<i>P. perniciosus</i>	Roedor marsupial ( <i>M. murina</i> )	capoeira	Cães, aves capoeira
<i>P. perniciosus</i>	Roedor marsupial ( <i>M. murina</i> )	curral ovelhas/canil	Cães, gatos, pombos, ovelhas
<i>P. perniciosus</i>	Roedor marsupial ( <i>M. murina</i> )	capoeira	Cães, aves capoeira, coelhos
<i>P. aiasi</i>	Galináceo ( <i>G. galus</i> )	capoeira	Cães, aves capoeira
<i>P. sergenti</i>	Humano ( <i>H. sapiens</i> )	coelheira/pocilga	Cães, aves capoeira, coelhos, ovelhas, porcos
<i>P. sergenti</i>	Galináceo ( <i>G. galus</i> )	curral ovelhas e cabras	Aves capoeira, cães, coelhos, ovelhas, porcos

Nos biótopos peridomésticos, observou-se que 50% das fêmeas flebotomínicas se alimentaram numa das espécies de vertebrado doméstico presente no abrigo (menos de 2 m da armadilha CDC). Este valor sobe para 62,5% (10/16) se incluirmos as espécies de animais domésticos presentes num raio de 30 m da armadilha CDC. Incluindo as fêmeas alimentadas em roedores, animais que não foram observados nos

biótopos de captura, mas que possivelmente estariam presentes nos mesmos, o valor sobe para 87,5%. Para as restantes duas fêmeas, responsáveis por 12,5% (2/16) da amostra de biótopos peridomésticos, numa detectou-se DNA humano, e na outra DNA bovino.

Apesar de em 81,2% (13/16) dos locais de captura peridomésticos existirem cães a menos de 30 m da armadilha CDC, não foram capturadas fêmeas alimentadas em canídeos.

Nas duas fêmeas capturadas em zonas silváticas (biótopo do tipo “mato”), detectou-se DNA de morcego e DNA humano, respectivamente. O local de captura desta última, apesar de ser um biótopo típico de mato, apresentava sinais de presença humana (depósito de lixo) (Fig. 52).



**Figura 52** - Biótopo do tipo “mato”, onde foi capturada uma fêmea de *P. perniciosus* alimentada em humano (fotografia de Sofia Branco, 2010).

## 4 - Discussão e Conclusões

À semelhança do que tem sido observado na maioria das regiões estudadas do território Continental português, nomeadamente nos Distritos de Coimbra, Lisboa, Setúbal, Beja e Faro (descritos no capítulo 1, ponto 1.3.1, Quadro 4), *P. perniciosus* foi a espécie dominante no Concelho de Torres Novas, com uma abundância relativa (73,69%, 930/1262), que excedeu as abundâncias acumuladas das restantes espécies detectadas neste Concelho: *S. minuta* (11,57%, 146/1262), *P. ariasi* (8,16%, 103/1262) e *P. sergenti* (6,58%, 83/1262).

Comparando (através do teste de qui-quadrado) as abundâncias relativas obtidas neste estudo com as abundâncias relativas médias dos estudos anteriormente efectuados na região Centro do país (Distritos de Coimbra, Lisboa e Setúbal), com o mesmo método de captura (Afonso *et al.*, 2004 e 2005; Pereira *et al.*, 2009; Amaro, 2010), detectaram-se diferenças estatisticamente significativas para *P. perniciosus* (73,69% vs 86,2%,  $p < 0,001$ ), *P. sergenti* (6,6% vs 2,9%,  $p < 0,001$ ) e *S. minuta* (11,57 vs 3,6,  $p < 0,001$ ). Para *P. perniciosus* e *S. minuta* as variações são acentuadas, entre os vários estudos, com alguns a apresentarem abundâncias mais baixas, e outros abundâncias mais elevadas do que as observadas no presente trabalho. Estas variações podem ser devidas à prospecção de diferentes tipos de biótopos, a diferentes períodos de captura ou a oscilações climáticas anuais.

Apenas para *P. sergenti* as abundâncias relativas obtidas nos estudos anteriores foram consistentemente mais baixas do que as observadas na região de Torres Novas, com 4% (198/4931) no estudo mais recente (Amaro, 2010) e inferior a 1% nos restantes (Afonso *et al.*, 2004 e 2005; Pereira *et al.*, 2009). Devido aos reduzidos valores das abundâncias relativas verificados em estudos anteriores, é considerada uma espécie rara a Norte do Tejo (Rés, 1957; Afonso *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2009), pelo que o resultado obtido no presente trabalho (6,58%, 83/1262), sugere que possa estar a expandir-se para latitudes mais elevadas, quer por efeito de alterações climáticas que possam estar em curso, promovendo uma maior aridização do território, ou por uma adaptação a regiões mais húmidas (apresenta alguma plasticidade em termos bioclimáticos). Por outro lado, podem simplesmente ter sido prospectados tipos de biótopos mais propícios à presença da espécie, ou existirem condições microclimáticas

mais favoráveis em algumas zonas do Concelho, particularmente nas freguesias de Ribeira Branca e Zibreira (freguesias contíguas), onde as densidades desta espécie foram mais elevadas.

A ausência de *P. papatasi* era já esperada, dado que esta espécie, para além de ser considerada rara no país, não é capturada a Norte do Concelho de Mourão desde 1912 (França, 1913; Rés, 1957).

A razão dos sexos foi acentuadamente a favor dos machos nas espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi*. Este enviesamento a favor dos machos é geralmente atribuído à proximidade de criadouros, uma vez que os machos são considerados mais sedentários que as fêmeas (Killick-Kendrick *et al.*, 1984; Bettini *et al.*, 1986; Killick-Kendrick, 1987; Schlein *et al.*, 1989). Em concordância, assume-se que o resultado observado no presente estudo, indica que as capturas flebotómicas foram efectuadas na proximidade de criadouros das espécies do Subgénero *Larrousius* (*P. perniciosus* e *P. ariasi*), pelo menos em alguns dos biótopos prospectados, onde as densidades foram mais elevadas.

A presença de machos em que não tenha ocorrido rotação da genitália é também indicativa de que a captura foi realizada na proximidade de criadouros, dado que esta rotação ocorre nas primeiras 24 horas após a eclosão. Assim, a captura de um macho *P. sergenti* com rotação incompleta da genitália, numa “coelheira/pocilga” sugere que este biótopo possa tratar-se de um habitat larvar, para além de local de repouso ou alimentação, para esta espécie.

Todas as espécies foram assinaladas desde Junho, e dado que não foram realizadas capturas anteriores a este mês, não se exclui a hipótese de que a actividade flebotómica tenha tido início nos meses antecedentes (Maio ou mesmo Abril). Tal como observado noutros estudos realizados em Portugal (Alves-Pires *et al.*, 2008), *P. perniciosus* apresentou o período de actividade mais alargado, tendo sido a única espécie capturada em Novembro, e *P. sergenti* apresentou o período de actividade mais curto, confinado de Junho a Setembro. No presente estudo, *S. minuta* e *P. ariasi* apresentaram um período de actividade intermédio, de Junho a Outubro.

Considerando o período em que foram efectuadas as capturas (Junho a Novembro) e analisando as densidades mensais, observaram-se evoluções unimodais para todas as espécies à excepção de *P. ariasi*, que apresentou uma evolução difásica. O

número de gerações por ano das várias espécies é variável, quer entre espécies, quer de região para região, ou em diferentes períodos de estudo, o que pode ser devido a diferentes métodos de captura, diferentes biótopos prospectados, variações no clima ou mesmo a características genéticas das populações estudadas (Pires, 2000). Verifica-se, no entanto, que em Portugal, a existência de um pico de actividade dos imagos é usual para *P. perniciosus*, *P. sergenti*, e *S. minuta* (Azevedo, 1946; Rés, 1957; Pires, 1985; Alves-Pires & Ribeiro, 1991; Alves-Pires *et al.*, 2004; Afonso *et al.*, 2005; Alves-Pires *et al.*, 2008, Maia *et al.*, 2009). *P. ariasi*, à semelhança do observado em Espanha (Morillas-Marquez *et al.*, 1983; Galvéz *et al.*, 2010), não exhibe em Portugal um comportamento uniforme, apresentando quer ciclos difásicos (Alves-Pires & Ribeiro, 1991; Afonso *et al.*, 2005; Afonso *et al.*, 2007), como foi observado no presente estudo, quer ciclos monofásicos (Rés, 1957; Azevedo, 1946; Pires, 1985; Maia *et al.*, 2009).

De notar que, para espécies com períodos de actividade relativamente longos, alguns autores sugerem que, a aparente evolução unimodal corresponde na realidade a vários picos de actividade dos imagos, com sobreposição de gerações, mas que este facto passe muitas vezes despercebido devido a que, na maioria dos estudos os resultados sejam agrupados por mês, e não numa menor escala temporal (Rioux *et al.*, 1969; Ready & Croset, 1980). Com base nesta sugestão, realizou-se isoladamente uma análise da variação da densidade por semana, verificando-se a existência de dois picos de densidade para *P. perniciosus* (semana de 24 a 30 de Julho - 8,1 flebótomos/armadilha CDC/noite e de 11 a 17 de Setembro - 15 flebótomos/armadilha CDC/noite) e para *S. minuta* (24 a 30 Julho - 1,5 flebótomos/armadilha CDC/noite e 28 de Agosto a 3 de Setembro - 2,25 flebótomos/armadilha CDC/noite), o que sugere a existência de duas gerações anuais para estas espécies.

Para *P. ariasi* e *P. sergenti* a variação da densidade semanal foi consistente com a mensal, observando-se dois picos de densidade para *P. ariasi* (26 de Junho a 2 de Julho - 3,78 flebótomos/armadilha CDC/noite e 11 a 17 de Setembro - 1,13 flebótomos/armadilha CDC/noite) e um único máximo na densidade de *P. sergenti* (24 a 30 Julho - 1,1 flebótomos/armadilha CDC/noite).

A variação observada na densidade por semana sugere que o multivoltinismo, ou seja a existência de várias gerações anuais, seja comum, em Portugal, para *P.*

*perniciosus* e *S. minuta*, contrariamente ao que geralmente é reportado no país (Azevedo, 1946; Rés, 1957; Pires, 1985; Alves-Pires & Ribeiro, 1991; Alves-Pires *et al.*, 2004; Afonso *et al.*, 2005; Alves-Pires *et al.*, 2008, Maia *et al.*, 2009).

Apesar do referido, optou-se pelas densidades calculadas por mês, por permitir uma maior facilidade na análise dos dados, permitir a comparação com outros estudos e com os dados climáticos fornecidos pelo Instituto de Meteorologia, I.P., Portugal, e para diminuir o enviesamento que possa ser causado por outros factores, como as capturas não terem sido realizadas sempre no mesmo local, ou o diferente número de dias de captura por semana. Assim, retornando aos dados agrupados por mês, os picos de actividade observados para *P. perniciosus* (Agosto e Setembro) e para *P. ariasi* (Junho e Setembro) são coincidentes com uma maior proporção de machos nas capturas, e, como seria de esperar, ocorrem posteriormente aos picos na proporção de fêmeas alimentadas: Julho para *P. perniciosus* e Agosto para *P. ariasi*. Provavelmente, se tivessem sido realizadas capturas em Maio também se teria observado uma maior proporção de fêmeas de *P. ariasi* alimentadas.

Observou-se, para todas as espécies, um decréscimo da razão dos sexos do penúltimo para o último mês de captura. Este decréscimo no final da estação de actividade é comum, uma vez que por norma os machos têm uma longevidade menor (Ivović, 2010), e nesta fase existe uma maior proporção de fêmeas grávidas (Lawyer & Perkins, 2000), cuja oviposição contribuirá para a geração do ano seguinte. Para *P. ariasi* e *P. perniciosus*, os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, dado que todas as fêmeas capturadas no último mês em que se detectou actividade das espécies, estavam grávidas. Para *P. sergenti* e *S. minuta*, não se observou, no entanto, esta tendência.

Considera-se que as condições climáticas, principalmente a temperatura, a humidade relativa e a precipitação, sejam os factores que mais fortemente afectam a distribuição e o período de actividade flebotomínica (Rioux *et al.*, 1984; Rispaill, 2002; Afonso & Alves-Pires, 2008). Relativamente à precipitação, na região estudada, observou-se que de Junho a Outubro apenas em dois dias ocorreu chuva fraca, e de curta duração (realizaram-se capturas nestes dias), e durante o mês de Novembro, apesar de ter sido um mês bastante chuvoso, apenas se realizaram capturas nos dias sem chuva.



Considerando estes aspectos, e dado que a precipitação se reflecte também na humidade relativa, optou-se por não incluir esta variável nas análises estatísticas.

Para a temperatura e a humidade relativa médias, observou-se que a relação entre estes factores foi inversa, com maiores temperaturas a corresponderem a humidades relativas mais baixas e vice-versa. Ambas as variáveis apresentaram uma associação estatisticamente significativa com a presença das espécies *P. perniciosus* (OR ajustado: 2,53 para temperatura e 0,83 para humidade) e *P. sergenti* (OR ajustado: 5,92 e 0,65), com o aumento da temperatura a aumentar o risco de presença, e o aumento da humidade a diminuir este risco. Este efeito foi mais acentuado para *P. sergenti* do que para *P. perniciosus*, o que está de acordo com a sua preferência por bioclimas mais áridos (Rioux *et al.*, 1984). Para *S. minuta*, apenas se verificou associação com a temperatura, com o aumento desta a ter um efeito menos acentuado no risco de presença desta espécie do que foi observado para *P. perniciosus* e *P. sergenti* (OR ajustado: 1,22).

A densidade flebotomínica mensal máxima para o total de espécies foi observada em Agosto, coincidente com o máximo de temperatura média (25,6°C) e o mínimo de humidade relativa média (60%). Analisando a variação por espécie constatou-se, no entanto, que à excepção de *S. minuta*, os picos de actividade dos imagos não coincidiram com este mês, tendo ocorrido no mês seguinte para *P. perniciosus* e no mês anterior para *P. sergenti*. Estas diferenças podem estar relacionadas com diferentes durações das várias fases do ciclo de vida para cada uma das espécies e/ou diferentes inícios do período de actividade.

*P. ariasi* apresenta preferência por bioclimas mais húmidos, do que as restantes espécies mencionadas (Rioux, 2001; Rioux & de La Rocque, 2003). Neste estudo, não se observou associação significativa desta espécie com as variáveis temperatura e humidade relativa. A sua densidade diminuiu, no entanto, durante os meses mais quentes e secos (Julho e Agosto), teve um máximo nos meses em que a temperatura e humidade tiveram valores intermédios (Junho e Setembro), e diminuiu progressivamente a partir de Outubro, coincidente com a descida acentuada da temperatura e aumento da humidade.

A preferência desta espécie por bioclimas mais húmidos pode também explicar as maiores densidades observadas na freguesia do Pedrogão. Esta freguesia localiza-se

no sopé da Serra de Aire, sendo a mais fortemente influenciada pela presença deste sistema montanhoso. Comparando a precipitação medida em três estações do Concelho de 1980 a 1999 (Alcorochel, Torres Novas e Pedrogão), o Pedrogão surge com uma média de 857 mm, superior à observada em Alcorochel com 733 mm, e em Torres Novas com 723 mm. Anualmente, apresenta ainda menor número de horas de insolação, e maior número de dias com precipitação superior a 1 mm, do que as restantes freguesias (Simões, 2003). Assim, o Pedrogão é a freguesia com maior humidade do Concelho, o que possivelmente explica os valores máximos de densidade (1,1 flebótomos/armadilha CDC/noite) e abundância relativa de *P. ariasi*, observados nesta freguesia (31%, 43/140) (a abundância relativa de *P. perniciosus* foi de apenas 48%, 67/140).

Relativamente ao nível de vento observado nos locais de captura, constatou-se que como esperado, o vento forte diminui significativamente a probabilidade de ocorrência de imagos para as espécies *P. perniciosus* e *P. ariasi* (OR ajustado: 0,07 e 0,12, respectivamente). Para *P. perniciosus*, verificou-se ainda uma associação significativa com o nível de abrigo, com a probabilidade de presença da espécie a aumentar progressivamente com o mesmo. No caso de *P. sergenti* e *S. minuta* não se observou associação com nenhuma das variáveis. No entanto, estas variáveis foram tratadas como categóricas com vários níveis (três, para o nível de vento e cinco, para o nível de abrigo), pelo que é provável que apenas tenha sido possível detectar a associação com *P. perniciosus* devido ao maior número de biótopos positivos para esta espécie (138), e, que o número de biótopos positivos para as restantes não tenha sido suficiente para detectar este efeito, à excepção da associação de *P. ariasi* com o nível de vento (variável com menor número de categorias).

A variação altitudinal nos biótopos prospectados foi inferior a 200 metros (153 metros), pelo que não é de estranhar a ausência de influência da altitude na distribuição flebotomínica neste estudo.

Em termos de tipo de biótopo, *P. perniciosus* aparenta apresentar, na região estudada, preferência por biótopos peridomésticos, particularmente por currais de ovelhas e cabras, com maior risco de ocorrência da espécie quando na presença destes abrigos (OR ajustado de 3,15 e 8,37, respectivamente) e maiores densidades

flebotomínicas a verificarem-se nos currais destes animais ou na sua presença a menos de 30 metros da armadilha CDC. Verificou-se ainda associação entre a abundância da espécie e o número de ruminantes no local (cabras, ovelhas e cavalos).

Nos referidos biótopos, para além de abrigo e condições microclimáticas estáveis, existe geralmente acumulação de grande quantidade de matéria orgânica (fezes), fornecendo aos flebótomos, num único local, abrigo trófico, de repouso e de oviposição. A tosquia das ovelhas, durante os meses quentes, facilita ainda a picada por parte destes insectos. Outros autores referiram já a preferência desta espécie por biótopos peridomésticos (Pires, 2000; Bongiorno *et al.*, 2003; Ghrab *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2008), e a presença preferencial em abrigos de gado foi também já assinalada (Azevedo, 1946; Guernaoui & Boumezzough, 2009; Martin-Sánchez *et al.*, 2009).

Um exemplar de *P. perniciosus* capturado num curral de ovelhas encontrava-se parasitado por ácaros, sendo a taxa de infestação relativamente baixa (0,16%, 2/1262). A presença destes ectoparasitas em flebótomos foi já detectada por vários autores, e pensa-se que sejam adquiridos nos habitats larvares ou de repouso do insecto, mas desconhece-se, até à data, a sua influência na longevidade dos imagos (Ferreira & Ferreira, 1944; Abonnenc, 1970; Lewis & Macfarlane, 1981; Martinez-Ortega *et al.*, 1983; Swift, 1987). Noutros estudos realizados em Portugal foram detectados endoparasitas (não *Leishmania*) em flebótomos, como nemátodes (Pires, 2000; Maia *et al.*, 2011) e coccídeos (Afonso *et al.*, 2009). Seria interessante, de futuro, avaliar o impacte destes parasitas nas populações de flebótomos, pela possibilidade de poderem vir a ser utilizados em estratégias de controlo biológico.

*P. ariasi* apresentou maiores densidades em biótopos domésticos (apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas), contrariamente ao observado por outros autores, que descrevem para esta espécie preferência por biótopos peridomésticos (Rés, 1957; Killick-Kendrick, 1987; Guernaoui & Boumezzough, 2009), ou mesmo silváticos (Pires, 1988).

Para *S. minuta* apesar de as densidades serem semelhantes em biótopos domésticos e peridomésticos, a presença de ovelhas no local apresentou também associação com o risco de ocorrência de imagos (OR ajustado:2,83), e com a sua abundância ( $r_s$ :0,21). Possivelmente por, à semelhança do observado para *P.*

*perniciosus*, os currais serem adequados ao repouso e oviposição uma vez que em termos alimentares é predominantemente herpetófila. Criadouros larvares com presença de ambas as espécies, foram inclusivamente já assinalados na Sardenha (Bettini *et al.*, 1986).

*P. sergenti* é uma espécie geralmente associada à actividade humana, e, dependendo do ano ou região em estudo tem sido observada a sua preferência por biótopos domésticos (Svobodová *et al.*, 2003; D'Urso *et al.*, 2004), peridomésticos (Alves-Pires *et al.*, 2004 e 2008; Tababbi *et al.*, 2011) ou ambos (Rioux *et al.*, 1986; Guernaoui *et al.*, 2005; Ramaoui *et al.*, 2008). Os resultados do presente estudo, com capturas positivas em biótopos domésticos e peridomésticos e a total ausência em biótopos silváticos, são concordantes com aquela tendência.

Apesar de as diferenças não serem estatisticamente significativas, as maiores densidades foram observadas em biótopos peridomésticos (0,4 vs 0,2 flebotomos/armadilha CDC/noite), verificando-se ainda associação da espécie com a presença de coelheiras, com maiores densidades e maior risco de presença da espécie neste tipo de biótopo (OR ajustado: 14,73), e a densidade flebotomínica positivamente correlacionada com a abundância de coelhos no local ( $r_s$ :0,18). Estes resultados, em combinação com a captura de um macho com rotação incompleta da genitália numa coelheira/pocilga, sugerem que nesta região, as coelheiras são os habitats preferenciais desta espécie como local de oviposição e/ou repouso.

O maior risco de ocorrência de *P. sergenti* na proximidade de aves de capoeira (OR ajustado: 3,18), o facto de que todas as fêmeas alimentadas foram capturadas em locais com presença destas aves a menos de 30 metros da armadilha CDC e a identificação de uma fêmea alimentada num galináceo (1/3), sugerem ainda que as capoeiras possam ser utilizadas como abrigo trófico.

Nos biótopos domésticos, as maiores densidades flebotomínicas observadas em armazéns de lenha, especialmente com a presença de animais domésticos de livre circulação pelo biótopo amostrado, sugerem que estes armazéns possam, em ambientes domésticos, ser utilizados como local de repouso ou oviposição por parte dos imagos.

Globalmente, dos 35 tipos de biótopos prospectados, em 32 assinalou-se a presença de pelo menos uma espécie flebotomínica, demonstrando a grande variedade

de possíveis habitats destes pequenos dípteros. No presente estudo, as capturas apenas não tiveram sucesso nos biótopos de tipo “poço” (nº de CDC utilizadas: 2), “casa - garagem” (nº de CDC:1) e “canavial” (nº de CDC:1). Contudo, o baixo número de capturas realizadas nestes locais, não permitem, garantir com exactidão que os flebótomos estejam ausentes nestes três tipos de biótopos na região. Inclusivamente, Pires (2000) constatou a presença das quatro espécies flebotomínicas referidas, em poços no Sotavento Algarvio.

A presença de ninhos com andorinhas na proximidade das armadilhas CDC influenciou positivamente a probabilidade de ocorrência de todas as espécies flebotomínicas capturadas. Em alguns casos esta probabilidade foi até cerca de 10 vezes superior do que na sua ausência (*P. perniciosus*, *P. sergenti* e *S. minuta*). As espécies de hirundínídeos mais comuns em Portugal Continental são a andorinha dos beirais (*Delichon urbica*) e a andorinha das chaminés (*Hirundo rustica*) (Rodrigues & Crespo, 1991). Os ninhos, em forma de taça, com uma pequena abertura no topo, são construídos com pedaços de lama e palha, colados com saliva, apresentando uma superfície irregular e com reentrâncias. A presença de ectoparasitas, como pulgas (Siphonaptera), percevejos (Hemiptera), ácaros (Acarina) e moscas (Calliphoridae) é comum (Kaczmarek, 1993), colocando-se assim a hipótese de os ninhos poderem ser também utilizados pelos flebótomos como local de repouso e/ou criadouros. O facto de estes dípteros poderem utilizar ninhos de aves para repouso e oviposição foi já sugerido por vários autores (Killick-Kendrick, 1999). Apesar de não terem sido capturadas fêmeas alimentadas nestas aves, as andorinhas tem hábitos diurnos, refugiando-se no ninho ao anoitecer, período em que estão vulneráveis à picada destes insectos.

Alguns autores referem ainda que os hirundínídeos constroem os ninhos em locais onde existam solos húmidos e abundem as espécies de insectos de que se alimentam, como os coleópteros e afídeos (Bryant, 1975, Snow & Perrins, 1998). Estes últimos são frequentemente utilizados como fonte de açúcares pelos flebótomos, e assim, a presença destas aves e flebotomíneos no mesmo local, pode ser determinada pela presença de uma fonte alimentar, ou outro factor comum, e não por uma associação directa entre ave e flebótomo.

Um resultado aparentemente peculiar, surgiu com a associação estatisticamente significativa da presença de *S. minuta* com a presença de gatos num raio de 30 metros da armadilha CDC (OR ajustado: 2,56), aumentando o risco de ocorrência do flebotomíneo, bem como a ligeira associação observada entre a sua abundância e o número de gatos no local ( $r_s:0,17$ ). Sendo esta espécie flebotomínica maioritariamente herpetófila, principalmente de geonídeos, e o gato doméstico um dos principais predadores destes pequenos répteis (Rocha & Jesus, 2009), seria de esperar que a presença dos felinos exercesse uma influência negativa, diminuindo o número de potenciais hospedeiros e consequentemente, o número de flebótomos no local.

Em meio rural, no entanto, é comum serem os gatos a “adoptar” determinados locais, e não serem “adoptados” pelos proprietários, que muitas vezes toleram a sua presença pelo facto de controlarem as populações de outros animais indesejados, como roedores e répteis. Assim, uma das hipóteses que se coloca, à semelhança do já sugerido no caso das andorinhas, é a de que tanto os gatos como *S. minuta*, sejam atraídos ao local pela presença de potenciais presas, e apesar do efeito de predação exercido pelos felinos, o número de répteis ser superior ao observado noutros habitats.

Uma outra hipótese, é a de que *S. minuta* apresente, nesta região, preferência trófica por gatos, pois apesar de ser pouco frequente, sabe-se que os membros deste género podem alimentar-se em mamíferos (Mutinga *et al.*, 1986 e 1994; Boakye *et al.*, 2005; Kweku *et al.*, 2011; Senghor *et al.*, 2011), suspeitando-se do seu papel vectorial na transmissão de *Leishmania* em algumas regiões. Esta possibilidade pode assim ter implicações na transmissão de *L. infantum* no Concelho, caso se venha a confirmar que os gatos são reservatórios habituais do parasita (Maia *et al.*, 2008 e 2010). Contudo, no presente estudo, a fonte sanguínea da única fêmea para a qual se conseguiu amplificação do segmento do gene Citocromo b, não apresentou homologia com as espécies presentes no GenBank, não se tendo, portanto, alimentado num gato.

Em termos de vegetação, Killick- Kendrick & Killick-Kendrick (1999) sugeriram que a distribuição de *P. ariasi* esteja limitada a regiões onde existam azinheiras (*Quercus ilex*), devido à especialização desta espécie flebotomínica em alimentar-se nas secreções açucaradas do afídeo *Lachnus roboris*, parasita comum nas folhas daquela planta. Actualmente, sabe-se que este afídeo também pode ser observado

noutras espécies de *Quercus* (Lubiarz, 2007). Em, 2010, num estudo realizado em Espanha, Gálvez e colaboradores observaram uma associação estatisticamente significativa entre a presença de azinheira, e as densidades, tanto de *P. ariasi* como *P. perniciosus* (Gálvez *et al.*, 2010).

No corrente estudo, contrariamente ao esperado, verificou-se que a presença de ambas as espécies do Subgénero *Larroussius* foi positivamente influenciada não pela existência de carvalhos/azinheiras (não se fez distinção entre as várias espécies do género *Quercus*) mas pela existência de pinheiros como vegetação dominante. Observa-se, no entanto, que no Concelho de Torres Novas a presença de *Quercus* sp. é rara como flora dominante (dos casos em que foi registada como dominante, a maioria foi em codominância com outro tipo de vegetação), mas são comuns exemplares em áreas onde o pinheiro predomina (Ferreira, 2004), pelo que os resultados são compatíveis com os obtidos pelos autores acima citados.

Na análise das preferências hemáticas, a maioria das fêmeas em que foi identificada a fonte da refeição sanguínea era *P. perniciosus*. Para quatro destas fêmeas a fonte sanguínea foi identificada como *Marmosa murina*, um pequeno roedor marsupial da América do Sul. As fêmeas foram capturadas em diferentes locais, e dada a baixa probabilidade de ter ocorrido introdução desta espécie no nosso país, bem como o nível de homologia das sequências obtido, de apenas cerca de 80%, a explicação mais plausível é que existam semelhanças da sequência do segmento do gene Citocromo b amplificado, com alguma espécie de roedor placentário presente na região geográfica estudada (ou possivelmente outro animal), e cuja sequência não esteja ainda disponível no GenBank. Assim, assume-se, neste estudo, que estas quatro fêmeas se alimentaram em roedores.

Observou-se que as fêmeas de *P. perniciosus* efectuaram refeições sanguíneas numa grande variedade de hospedeiros vertebrados, na sua maioria ruminantes (38,89%, 7/18), mas também em aves de capoeira (5,56%, 1/18), roedores (22,22%, 4/18), quirópteros (5,56%, 1/18), lagomorfos (5,56%, 1/18), humanos (5,56%, 1/18) e outros animais não identificados (16,67%, 3/18).

Verificou-se, na maioria das vezes, uma coincidência entre a fonte da refeição sanguínea e as espécies de vertebrados presentes no local de captura, ou num raio de 30

metros da armadilha CDC (86,67%, 13/15, para os casos em que foi possível identificar a fonte sanguínea). A exceção ocorreu para uma fêmea alimentada em humano num biótopo de tipo “mato”, mas onde havia sinais de presença humana, e uma fêmea alimentada em bovino num biótopo do tipo “capoeira”, onde não se observaram bovinos na proximidade.

Estes resultados apontam para que na região estudada, à semelhança do que foi observado noutras regiões, *P. perniciosus* seja uma espécie oportunista, alimentando-se nos animais a que mais facilmente tem acesso (Bongiorno *et al.*, 2003, Rossi *et al.*, 2008). Apresentou, no entanto, preferência aparente por mamíferos, pois apesar de quatro fêmeas terem sido capturadas em capoeiras, e da presença de aves domésticas em 87% dos locais de captura, apenas uma se alimentou em galináceos. Este aspecto foi já referido por De Colmenares e colaboradores (1995), num estudo realizado em Espanha, no qual se verificou que das várias fêmeas ingurgitadas, capturadas em capoeiras, nenhuma se havia alimentado nestes animais. Estes resultados são concordantes com os resultados obtidos em Portugal, em que na maioria dos casos, a percentagem de fêmeas alimentadas em aves não excede os 5% (Alves-Pires *et al.*, 1992; Azevedo & Teixeira, 1946). Na Região Algarvia, contudo, a percentagem observada foi superior (47% - Pires, 2000; 10% - Mendonça, 2011).

Contrariamente ao observado noutras regiões de Portugal (Azevedo & Teixeira, 1946; Pires, 2000), neste estudo não foram capturadas fêmeas alimentadas em cães, apesar da presença de cães em 67% dos locais prospectados. É de salientar, no entanto, que apenas quatro fêmeas foram capturadas directamente em biótopos do tipo “canil”. Três destes eram mistos com currais de ovelhas ou cabras, existindo dominância em número por parte dos ruminantes nestes biótopos e o quarto, um canil na proximidade de uma coelheira densamente ocupada. Estes resultados não contrariam o comportamento oportunista da espécie, que se traduz não só por se alimentar nos animais mais próximos, mas também nos de maior porte e/ou presentes em maior número.

Assim, verificou-se nesta região que *P. perniciosus* não apresentou preferência alimentar por nenhuma das espécies de vertebrados susceptíveis a *Leishmania*, e a ausência de fêmeas infectadas poderia sugerir uma importância vectorial reduzida. No



entanto, num estudo em Itália em que se obtiveram resultados de preferências alimentares semelhantes, e em que *P. perniciosus* foi a única espécie comprovadamente vectora capturada, observou-se intensa transmissão do parasita, com 33,3% dos cães seropositivos (Rossi *et al.*, 2008). Em combinação com o comportamento oportunista exibido (podendo facilmente alimentar-se em cães e humanos), o facto de uma fêmea se ter alimentado num ser humano, e as baixas taxas de infecção geralmente observadas noutras regiões, a importância de *P. perniciosus* como vector de *L. infantum* no Concelho não pode ser descurada.

*P. ariasi*, apesar de ter sido capturado em menor quantidade, foi a única espécie na qual se detectou infecção por *L. infantum*, com uma taxa de infecção de 4% (1/25). O facto de a fêmea se encontrar grávida, sugere que não se trata apenas de uma infecção accidental, mas que é um vector competente, pois o tempo necessário à metaciclogénese é coincidente com o tempo de desenvolvimento dos ovos após a refeição sanguínea.

A taxa de infecção observada para esta espécie encontra-se entre os valores já observados noutras regiões de Portugal (entre 1,9% e 4,9%) (Alves-Pires *et al.*, 1984; Alves-Pires *et al.*, 1991; Afonso *et al.*, 2004), em Espanha (0,52 a 4,2%) e França (1,6% - 4%) (OMS, 2003). Esta espécie não é capturada infectada no território português desde 2002-2003 (Lisboa - Afonso *et al.*, 2004), tendo nos estudos mais recentes apenas sido capturadas fêmeas de *P. perniciosus* infectadas, nomeadamente na Região Algarvia (Maia *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2011). Os resultados do presente trabalho confirmam que *P. ariasi* mantém características vectoriais na transmissão de *L. infantum* no país e que a sua importância pode ser particularmente acentuada no Concelho de Torres Novas devido à preferência por habitats domésticos nesta região.

A época de maior risco de transmissão de *L. infantum* no Concelho correspondeu ao mês de Junho, ou seja, antes do início do Verão uma vez que a fêmea infectada foi capturada a 13 de Junho. Alguns investigadores sugerem que, contrariamente ao que foi observado, é no final do período de actividade que as maiores taxas de infecção são esperadas, pois quando a população é jovem e no auge da densidade, predominam as fêmeas nulíparas em busca da primeira refeição sanguínea e consequentemente ainda não infectadas (Rioux *et al.*, 1969; Lawyer & Perkins, 2000). Contudo, a detecção de *Leishmania* em fêmeas capturadas em Junho foi já reportada em Portugal por Pires

(2000), na Arrábida e no Alto Douro. O referido investigador capturou, igualmente, nos mesmos anos, fêmeas infectadas perto do final do período de actividade flebotómica (Setembro e Outubro), (Pires, 2000). Deve-se assim ter em conta que o período de transmissão apesar de se iniciar pelo menos em Junho, pode decorrer até ao Outono.

Relativamente ao método de diagnóstico molecular para determinação da infecção flebotómica, conclui-se que para identificação de *L. infantum*, a utilização dos “primers” cinetoplastidiais MC (MC1/MC2) foi mais eficaz do que a utilização dos “primers” ribossomais ITS1 (LITSR/L5.8S), o que demonstra a sua elevada sensibilidade. Utilizando os “primers” ITS1, com o volume estipulado no protocolo, após digestão com a enzima HaeIII, a quantidade de DNA não foi suficiente para visualização em gel de agarose. Mesmo aumentando cinco vezes o volume inicial, as bandas obtidas foram de difícil visualização.

No total, as duas espécies comprovadamente vectoras de *L. infantum* no país representaram 81,9% (1033/1262) dos exemplares capturados e encontram-se amplamente distribuídas no Concelho de Torres Novas [71,4% (65/91) das localidades prospectadas]. Este facto, conjuntamente com a captura de uma fêmea infectada e infectante, e a seroprevalência dos cães do Distrito, infectados com *Leishmania* (5 a 10% em 2009 - OnLeish, 2010), sugere que esta região possa ser considerada um novo foco de Leishmaniose em Portugal, adicionando-se aos focos já previamente assinalados (Trás-os-Montes e Alto Douro, Grande Lisboa / Arrábida e Sotavento Algarvio).

As áreas de maior risco de transmissão no Concelho são a freguesia do Pedrogão, devido à maior densidade de *P. ariasi*, e possivelmente a freguesia de São Pedro, pela maior densidade de *P. perniciosus* (apesar de as diferenças não terem sido estatisticamente significativas para esta freguesia e de não terem sido capturadas fêmeas desta espécie infectadas). A freguesia de S. Pedro, sendo a mais densamente povoada, apresenta um risco acrescido de transmissão ao ser humano.

A maior abundância relativa de *P. sergenti*, em relação a outras zonas da região Centro do país, associada ao facto de ter sido capturada uma fêmea alimentada num ser humano (33,33% 1/3), pode representar um risco acrescido de introdução de *L. tropica* nesta região. Esta introdução é possível caso ocorra contacto de flebótomos desta espécie com seres humanos infectados, quer estes sejam imigrantes ou viajantes vindos

do Norte de África ou subcontinente Indiano, ou mesmo militares destacados em países destas regiões.

Tendo em consideração não só o conhecimento da existência de leishmaniose canina na região mas também de todos os resultados obtidos a partir desta prospecção flebotómica, realizada pela primeira vez no Concelho de Torres Novas, sugerem-se as seguintes medidas de controlo em relação a esta zoonose, tendo em vista este complexo sistema biológico hospedeiros vertebrados (reservatórios/acidentais) – parasita – vectores:

1- Vacinação dos cães sempre que possível. Dado o elevado custo actual da CaniLeish® (única vacina actualmente comercializada em Portugal), infelizmente, a medida não será exequível para muitos proprietários. Contudo, uma vacinação canina eficaz garante maior protecção dos animais, e impede que estes se tornem futuros reservatórios do parasita.

2- Uso de coleiras ou substâncias repelentes, a partir de Abril até final de Novembro, em todos cães da região. Neste estudo, apesar da maior densidade de *P. ariasi* se ter verificado na proximidade de cães com este tipo de protecção, o uso correcto de coleiras e outras substâncias repelentes é comprovadamente eficaz na protecção dos cães contra a picada de flebótomos e aumenta ainda a mortalidade destes dípteros que neles se tentem alimentar (OMS, 2003).

Os resultados obtidos neste estudo podem simplesmente ser devidos a que nos locais onde se verificou o uso destas coleiras, as abundâncias de *P. ariasi* fossem já mais elevadas previamente ao uso dos repelentes, e, possivelmente, terá sido a ocorrência de casos de doença na área que consciencializou os proprietários para a necessidade de protegerem os seus animais. Por outro lado, em cerca de 80% (22/28) dos locais em que se verificou o uso de repelentes existiam outros animais domésticos que poderiam servir de fonte alimentar.

No caso de proprietários com um número elevado de animais, mantidos ao anoitecer em canis fechados, uma alternativa mais económica é a utilização de barreiras verticais com insecticidas piretróides residuais, como redes mosquiteiras, em redor dos canis.

3- Limpeza do ambiente peridoméstico, evitando a acumulação prolongada de fezes e outros detritos animais ou vegetais, que possam servir de potenciais criadouros flebotomínicos, e, no ambiente doméstico, pulverização de armazéns de lenha com insecticidas residuais.

4- Evitar o abrigo de cães, em conjunto, ou na proximidade de outros animais, principalmente ruminantes e coelhos, pelas maiores densidades observadas de *P. perniciosus* e *P. ariasi*, respectivamente, ou ainda na proximidade de ninhos de andorinhas devido à maior probabilidade da presença de ambas as espécies vectoras. Apesar de não terem sido capturados exemplares alimentados em cães, o carácter oportunista das espécies vectoras pode traduzir-se em maiores taxas de picada nos canídeos em locais com maiores densidades flebotomínicas.

5- Formação e informação sobre a leishmaniose e seus vectores, quer aos técnicos de saúde quer à população em geral. Também nas escolas poder-se-ia transmitir conhecimentos básicos sobre esta problemática, que afecta a região e o país em geral, para que não se continue a confundir mosquitos e flebótomos, os seus diferentes tipos de criadouros e os diferentes parasitas que transmitem.

6- Monitorização continuada – realização de estudos conjuntos, no que diz respeito aos hospedeiros reservatórios e vectores, durante pelo menos três anos seguidos, para um melhor conhecimento da realidade, tendo em vista as variações/alterações climáticas que, eventualmente, podem alterar a sazonalidade, a densidade, as taxas de infecção vectorial e os riscos de transmissão de *Leishmania* quer aos seres humanos quer aos cães e, eventualmente, aos gatos.

## Referências bibliográficas

- Abbasi, I., Cunio, R., Warburg, A., 2009. Identification of blood meals imbibed by phlebotomine sand flies using Cytochrome *b* PCR and Reverse Line Blotting. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 9 (1): 79-86.
- Abonnenc, E., 1970. Notes sur les Acariens parasites des Phlebotome. *Cah. ORSTOM., Ent. Mod. Parasitol.*, 8 (1): 89-94.
- Abonnenc, E., 1972. *Les Phlébotomes de la Région Éthiopienne (Diptera, Psychodidae)*. Office de La Recherche Scientifique et Technique outre Mer, Orstom, Paris : 289 pp.
- Abranches, P., Conceição-Silva, F.M., Ribeiro, M.M.S., Lopes, F.J., Gomes, L.T., 1983. Kala-azar in Portugal. IV. The wild reservoir: the isolation of *Leishmania* from a fox. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77: 420-421.
- Abranches, P., Conceição-Silva, F.M., Silva-Pereira, M.C.D., 1984. Kala-azar in Portugal V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrábida. *J. Trop. Med. Hyg.*, 87: 197-200.
- Abranches, P., Pires, C.A., 1980. O kala-azar em Portugal. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 3: 203-217.
- Adler, S., Theodor, O., 1957. Transmission of Disease Agents by Phlebotomine sand Flies. *Ann. Rev. Entomol.*, 2: 203-226.
- Afonso, M.O., Alves-Pires, C., 2008. Bioecologia dos vectores. In: G. Santos-Gomes e I.P. Fonseca, ed. *Leishmaniose canina.*, Chaves Ferreira - Publicações S.A. Lisboa: 27-40.
- Afonso, M.O., Baptista, S., Campino, L., Casimiro, E., Ready, R.P., Alves-Pires, C., 2006. Os flebótomos de Portugal – XIV. Distribuição e bioecologia de *Phlebotomus perniciosus* e *Phlebotomus ariasi*, vectores de *Leishmania infantum* em Portugal Continental, XII Congresso Ibérico de Entomologia, 11-14 de Setembro, Alicante, Espanha, *Abstract book*: 158.
- Afonso, M.O., Brazil, R., Alves-Pires, C., 2007. Carlos França in the Science (1877-1926). *Acta Parasitológica Portuguesa*, 14 (1-2): 23-26.

- Afonso, M.O., Campino, L., Cortes, Alves-Pires, C., 2005. The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII- Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrábida leishmaniasis focus. *Parasite*, 12: 69-72.
- Afonso, M.O, Cardoso, L., Anastácio, S., Janz, J.G., Semião-Santos, S., Sousa, S., Rodrigues, J., Rodrigues, M., Alves-Pires, C., 2007. The phlebotomine sand flies of Portugal- XI. Ecology of the leishmaniosis vectors in Alijó municipality, Alto Douro region, 2001. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 14 (1-2): 19-22
- Afonso, M.O., Cortes, S., Ramada, J., Capela, M.J., Alves-Pires, C., Campino, L., 2004. The importance of stray dogs in the transmission of *L. infantum* in periurban areas: epidemiological survey in the Lisboa region. IX European Multicolloquium of Parasitology, Valencia, Spain, 18-23 July. *Abstract book*: 152-153.
- Afonso, M.O., Lobo, M.L., Matos, O., Alves-Pires, C., 2009. Occurrence of *Adelina* sp. (Coccidia, Adeleidae) in *Sergentomyia minuta* (Diptera, Psychodidae) in Alto Douro, Portugal, 2009. XI Congresso Ibérico de Parasitologia. 15-18 Setembro, Lisboa, Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 16 (1/2): 176-177.
- Alcaide, M., Rico, C., Ruiz, S., Soringuer, R., Muñoz, J., Figuerola, J., 2009. Disentangling vector-borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. *PLoS ONE* 4(9): e7092. Doi:10.1371/journal.pone.0007092.
- Alexander, B., 2000. Sampling methods for phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.*, 14: 109-122.
- Alexander, B., Maroli, M., 2003. Control of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.*, 17: 1-18.
- Alvar, J., Canavate, C., Gutierrez-Solar, B., Jimenez, M., Laguna, F., Lopez-Velez, R., Molina, R., Moreno, J., 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10: 298-319.
- Alvares, D., 1910. Um caso de kala-azar infantil em Lisboa. *Medicina Contemporânea*, 13: 90-97.

- Alves, V.B., Freitas, R.A., Barret, T., 2008. *Lutzomyia maruaga* (Diptera: Psychodidae), a new bat-cave sand fly from Amazonas, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 103 (2): 251- 253.
- Alves-Pires, C., Afonso, M.O., Janz, J.G., Semião-Santos, S.J., 2004. The phlebotomine sand flies of Portugal. XII. The phlebotomine of the Évora leishmaniasis focus (1999-2000). *Acta Parasitológica Portuguesa*, 11 (1-2): 41-45.
- Alves-Pires, C., Campino, L., Afonso, M.O., Santos-Gomes G., Dedet, J.-P., Pratlong, F., 2001. Les phlébotomes du Portugal X- Infestation naturelle de *Phlebotomus perniciosus* par *Leishmania infantum* MON-1 en Algarve. *Parasite*, 8: 374-375.
- Alves-Pires, C., Campino, L., Janz, J.G., Afonso, M.O., 2008. Os flebótomos de Portugal. XIV – Os vectores de leishmaniose no foco zoonótico do Sotavento Algarvio. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 15 (1-2): 39-52.
- Alves-Pires, C., Capela, R.A., 1996. Phlébotomes du Portugal VIII. Première mention de *Phlebotomus (Paraphlebotomus) sergenti* Parrot, 1917 à l'île de Madère. *Parasite*, 3: 94.
- Alves-Pires, C., Capela, R.A., Pena, I., 1997. The phlebotomine sandflies of Portugal. IX. The occurrence of *Sergentomyia minuta* (Rondani, 1843) at the Salvage Grande Island (Madeira, Portugal). *Bol. Soc. Port. Entomol.*, 0 (178): 389-395.
- Alves-Pires, C., Novo, M.T., Sousa, C.A., 1992. Os flebótomos de Portugal. VII- Preferências hemáticas dos flebótomos (*Diptera, Psychodidae*) da região do Alto Douro. *Actas do V Congresso Ibérico de Entomologia*, Lisboa: 607-613.
- Alves-Pires, C., Ribeiro, H., 1991. The phlebotomine vectors of Portugal. V – Observations of the ecology of the vectors of leishmaniasis in the Alto-Douro region. *Parasitologia*, 33: 63-68.
- Alves-Pires, C., Santos-Gomes, G.M., Pratlong, F., Ribeiro, H., Campino, L., Abranches, P., 1991. Phlébotomes du Portugal. IV. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* MON-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 66 (1): 47-48.
- Amaro, F.I.F., 2010. *Phlebovirus*, importância em Saúde Pública em Portugal. Tese de Doutoramento. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa:202 pp.

- Amóra, S.S.A., Bevilaqua, C.M.L., Feijó, F.M.C., Alves, N.D., Maciel, M.V. 2009. Control of Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) leishmaniasis vectors. *Neotrop. Entomol.*, 38 (3): 303-310.
- Anagnostou, V., Pardalos, G., Athanasiou-Metaxa, M., Papa, A., 2011. Novel phlebovirus in febrile child, Greece [letter]. *Emerg. Infect. Dis.* (online) disponível em <http://www.cdc.gov/EID/content/17/5/940.htm> (Visitado a 3 Junho, 2011). Doi: 10.3201/eid1705.101958.
- Aransay, A.M., Scoulica, E., Tselentis, Y., 2000. Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by seminested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1933-1938.
- Azevedo, J. F., 1946. Novos dados sobre a biologia das espécies de *Phlebotomus* de Lisboa e arredores. *An. Inst.Med.Trop*, 3: 7-20.
- Azevedo, J.F., Teixeira, A.W.G., 1946. Sobre as preferências hemáticas das espécies portuguesas de *Phlebotomus*. *An. Inst. Med. Trop*, 3: 159-181.
- Bañuls, A.L., Hide, M., Prugnolle, F., 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in Parasitology*, 64: 1-109.
- Baptista, S., Afonso, M.O., Casimiro, E., Campino, L., Ready, R.P., Alves-Pires, C., 2007. Spatial distribution of *Leishmania* sand fly vectors in Portugal: risk areas, climate changes and impacts on tourism. International Conference on Climate Change Impacts on Tourism (CLITOP), 7-8 Setembro, Lisboa, Portugal. *Abstract book*.
- Barker, D.C., 1989. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology*, 99: 125 – 146.
- Bass, J.W., Vincent, J.M., Person, D.A., 1997. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: I. Bartonellosis and trench fever. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 16 (1): 2-10.
- Bates, P.A., 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.*, 37: 1097–1106.
- Benabdennbi I., Pesson B., Cadi-Soussi M., Morillas Marquez F. 1999. Morphological and isoenzymatic differentiation of sympatric populations of *P. perniciosus* and *P.*



- longicuspis* (Diptera: Psychodidae) in northern Morocco. *J. Med. Entomol.*: 36, 116-120.
- Beran B., 2010. *Epidemiology of leishmaniosis in southern Germany with emphasis on the family of Psychodidae, primarily Phlebotominae*. Faculty of Veterinary Medicine of the Ludwig Maximilians - University Munich: 124 pp.
  - Bettini, S., Contini, C., Atzeni, M.C., Tocco, G., 1986. Leishmaniasis in Sardinia. I. Observations on a larval breeding site of *Phlebotomus perniciosus*, *Phlebotomus perfiliewi* and *Sergentomya minuta* (Diptera: Psychodidae) in the canine leishmaniasis focus of Soleminis (Cagliari). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 80: 307-315.
  - Bettini S., Pozio E., Gradoni L. 1980. Leishmaniasis in Tuscany (Italy) (II): *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 77-83.
  - Blackwell, A., Brown, M., Mordue, W., 1995. The use of an enhanced ELISA method for the identification of *Culicoides* bloodmeals in host-preference studies. *Med. Vet. Entomol.*, 9: 214-218.
  - Bogdan, C., Schönián, G., Banüls, A.L., Hide, M., Pratlong, F., Lorenz, E., Rollinghoff, M., Mertens, R., 2001. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*, 32: 302-306. Doi: 10.1086/318476.
  - Bongiorno, G., Habluetzel, A., Khoury, C., Maroli, M., 2003. Host preferences of phlebotomine sandflies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Trop.*, 88: 109-116.
  - Boakye, D.A., Wilson, M., Kweku, M., 2005. A review of leishmaniasis in West Africa. *Ghana Med. J.*, 39 (3): 94-97.
  - Bray, D.P., Alves, G.B., Dorval, M.E., Brazil, R.P., Hamilton, J.G.C., 2010. Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* to experimental chicken sheds treated with insecticide. *Parasit. Vectors*, 11: 3-16.
  - Brazil, R.P., Oliveira, S.M., 1999. Parthenogenesis in the sandfly *Lutzomyia mamedei* (Diptera: Psychodidae). *Med. Vet. Entomol.*, 13 (4): 463-464.

- Brazil, R.P., Passos, W.L., Brazil, B.G., Temeljkovitch, M., Andrade-Filho J.D., 2010. Diptera, Psychodidae, Phlebotominae Rondani, 1840: Range extension and new records from lowland Bolivia. *Check List*, 6 (4): 587-588.
- Bryant, D.M., 1975. Breeding biology of house martins *Delichon urbica* in relation to aerial insect abundance. *Ibis*, 117: 180-216. Doi: 10.1111/j.1474-919X.1975.tb04206.x.
- Calheiros, J.M., Casimiro, E., Almeida, A.P.G., Alves-Pires, C., Collares Pereira, M., Cardoso, M.F., Santos-Silva, M., Afonso, M.O., Sousa, R., 2006. Saúde humana e implicações para o turismo (Capítulo 6). In: F.D. Santos e P. Miranda ed. *Alterações Climáticas em Portugal. Cenários, Impactos e Medidas de Adaptação - Projecto SIAM II*. Gradiva, Lisboa: 233-270.
- Campillo, M.C., Vazquez, F.A.R., Fernandez, A.R.M., Acedo, M.C.S., Rodriguez, S.H., Lopez-Cozar, I.N., Baños, P.D., Romerom H.Q., Varela, M.C., 1999. *Parasitología Veterinaria* (1ª ed.), Madrid: McGraw-Hill Interamericana: 651-665.
- Campino, L., Abranches, P., 2002. Leishmaniose Cutânea: uma doença rara em Portugal. *Acta Med. Port*, 15: 387-390.
- Campino, L., Capela, M.J.R., Maurício, I.L., Ozensoy, S., Abranches, P., 1995. O Kala-Azar em Portugal.IX.A região do Algarve: Inquérito epidemiológico sobre o reservatório canino no concelho de Loulé. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas*, 18: 189-194.
- Campino, L., Maia, C., 2010. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Med. Port.*, 23: 859-864.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M., Afonso, M.O., Dedet, J.P., 2006. Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Trop.Med. Int. Health*, 11: 1708-1714.
- Campino, L., Santos-Gomes, G.M., Pratlong, F., Antunes, F., Maurício, I., Dedet, J.P., Abranches, P., 1997. HIV/Leishmania co-infections in Portugal: diagnosis and isoenzyme characterization of *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 91: 433-436.
- Cardoso, L.M.M.L., 2004. Estudos de infecção canina por *Leishmania* no Alto Douro. Tese de doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro: 206 pp.

- Cardoso, L., Santos, H., Cordeiro-da-Silva, A., Pratlong, F., Dedet, J.P., Rodrigues, M., 2002. *Leishmania infantum* MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal. *Acta Tropica*, 83: 83-85.
- Casimiro, E., Calheiros, J.M., 2002. Human health. In: F.D. Santos, K. Forbes. e R. Moita, ed. *Climate change in Portugal. Scenarios, Impacts and Adaptation Measures-SIAM Project*. Gradiva, Lisbon: 241-300.
- Casimiro, E., Calheiros, J., Santos, F.D., Kovats, S., 2006. National assessment of Human health effects of climate change in Portugal: approach and key findings. *Environmental Health Perspectives*, 114 (12): 1950-1956.
- CDC - Center for disease control and prevention, 2011a. *Leishmania*, In: *Public Health Image Library (PHIL)* (online), disponível em <http://phil.cdc.gov/phil/quicksearch.asp> (Visitado a 19 Junho, 2011).
- CDC - Center for disease control and prevention, 2011b. Leishmaniasis, In: *Parasites and health* (online), disponível em <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Leishmaniasis.htm> (Visitado a 18 Junho, 2011).
- Chamkhi, J., Guerbouj, S., Ben Ismail, R., Guizani, I., 2006. Description de la femelle de *Phlebotomus (Larroussius) chadlii* Rioux, Juminer et Gibily (Diptera, Psychodidae). D'après un exemplaire capturé aux environs du kef (Tunisie). *Parasite*, 13: 299-303.
- Charrel, R.N., Izri, A., Temmam, S., Lamballerie, X., Parola, P., 2006. Toscana Virus RNA in *Sergentomyia minuta* Flies. *Emerg. Infect. Dis.*, 12 (8): 1299-1300.
- Chelbi, I., Zhioua, E., Hamilton, J.G.C., 2011. Behavioral evidence for the presence of a sex pheromone in male *Phlebotomus papatasi* Scopoli (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, 48 (3): 518-525.
- CIPA - Computer-aided Identification of Phlebotomine sandflies of America, (online), disponível em <http://cipa.snv.jussieu.fr/> (Visitado a 16 Junho, 2011).
- CMDFCI - Comissão Municipal de Defesa da Floresta Contra Incêndios, 2004. *Plano municipal de defesa da floresta contra incêndios, Torres Novas*. Câmara Municipal de Torres Novas. Caderno II: 61 pp.

- Comer, J., Kavanaugh, D.M., Stallnecht, D.E., Corn, J.L., 1994. Population dynamics of *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in relation to the epizootiology of vesicular stomatitis virus on Ossabaw Island, Georgia. *J. Med. Entomol.*, 31(6): 850-854.
- Comer, J.A., Tesh, R.B., 1991. Phlebotomine sand flies as vectors of vesiculoviruses: a review. *Parassitologia*, 33: 143- 150.
- Cortes, S., Maurício, I., Almeida, A., Cristovão, J.M., Pratlong, F., Dedet, J.P., Campino, L., 2006. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology International*, 55: 277-283.
- Cortes, S., Rolão, N., Ramada, J., Campino, L., 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98: 12-17.
- Coutinho, M.T.Z., Bueno, L.L., Sterzik, A., Fujiwara, R.T., Botelho, J.R., Maria, M., Genaro, O., Linardi, P.M., 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 128: 149-155.
- Dantas-Torres F., 2011. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends Parasitol.*: 27 (4): 155-159.
- Dantas-Torres, F., Latrofa M.S., Otranto, D., 2010. Occurrence and genetic variability of *Phlebotomus papatasi* in an urban area of southern Italy. *Parasites & Vectors*, 3: 77 Doi:10.1186/1756-3305-3-77.
- De Colmenares, M., Portús, M., Botet, J., Dobaño, C., Gállego, M., Wolff, M., Seguí, G, 1995. Identification of blood meals of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera: Psychodidae) in Spain by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay biotin/avidin method. *J. Med. Entomol.*, 32 (3): 229-233.
- De la Loma, A., Alvar J. J., Martinez Galiano, E., Blázquez, J., Alcalá Muñoz, A., Májera, R., 1985. Leishmaniasis or AIDS? *Trans. royal Soc. trop. Med. Hyg.*, 79: 421-422.
- Dedet, J. P., 1994. Leishmanioses dans le Monde. *Médecine et Armées*, 22: 7-10.

- Dedet, J.P., 2005. Stages in the identification of phlebotomine sandflies as vectors of leishmaniasis and other tropical diseases. *Parassitologia*, 47: 291-295.
- Depaquit, J., Grandadam, M., Fouque, F., Andry, P., Peyrefitte, C., 2010. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill.* (online) disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19507>, (Visitado a 14 Junho, 2011).
- Depaquit, J., Léger, N., Ferté, H., 1998a. The taxonomic status of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917, vector of *Leishmania tropica* (Wright, 1903) and *Phlebotomus similis* Perfiliev, 1963 (Diptera - Psychodidae). Morphologic and morphometric approaches. Biogeographical and epidemiological corollaries. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* , 91(4): 346-352.
- Depaquit, J., Léger, N., Killick-Kendrick, R., 1998b. Description de *Phlebotomus* (*Paraphlebotomus*) *riouxii* n.sp. (Diptera, Psychodidae) d'Afrique du Nord. *Parasite*, 5 (2): 151-158.
- Dereure, J., Vanwambeke, S.O., Male, P., Martinez, S., Pratlong, F., Balard, Y., Dedet, J.P., 2009. The potential effects of global warming on changes in canine leishmaniasis in a focus outside the classical area of the disease in Southern France. *Vect. Born. Zoon. Dis*, 9: 687-694.
- Desjeux, P., Alvar, J., 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 97 (Supl.1): 3-15.
- Dolmatova, A.V., Demina, N.A., 1971. *Les phlébotomes (Phlebotominae) et les maladies qu'ils transmettent*. Initiation - Documentacion technique, Orstom, Paris: 169 pp.
- Dougall, A., Alexander, B., Holt, D.C., Harris, T., Sultan, A.H., Bates, P.A., Rose, K., Walton, S.F., 2011. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int. J. Parasitol.*, 41: 571-579.
- Dougall, A., Shilton, C., Low Choy, J., Alexander, B., Walton, S., 2009. New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. *Epidemiol. Infect.*, 137(10): 1516-1520.

- D'Urso, V., Ruta, F., Khoury, C., Bianchi, R., Depaquit, J., Maroli, M., 2004. About the presence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 (Diptera: Psychodidae) in Eastern Sicily, Italy. *Parasite*, 11: 279-283.
- Ehrnst, A., Peters, C.J., Niklasson, B., Svedmir, A., Holmgren, B., 1985. Neurovirulent Toscana virus (a sand fly fever virus) in a swedish man after visit to Portugal. *The Lancet*, 325: 1212-1213.
- El-Hossary, S.S., 2006. *Morphological characteristics for sand fly taxonomy*. Research and Training Center on vectors of diseases, Ain Shams University, Cairo: 26 pp.
- El- Kammah, K. M., 1973. Studies of autogeny in *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.*, 10 (3): 261-262.
- Encyclopædia Britannica Online, 2011. *Bioclimatology*. (online) Disponível em: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/65813/bioclimatology> (Visitado a 16 Março, 2011).
- Farkas, R., Tánzos, B., Bongiorno, G., Maroli, M., Dereure, J., Ready, P.D., 2011. First Surveys to Investigate the Presence of Canine Leishmaniasis and Its Phlebotomine Vectors in Hungary. *Vector-Borne Zoonot. Dis.*, 11 (1). Doi: 10.1089/vbz.2010.0186. *In press*.
- Feliciangeli, M.D., 2004. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.*, 18: 71-80.
- Fernandez Cotarelo, M.J., Abellan, M.J., Guerra Vales, J.M., Martinez, S.P., Rodrigo Gomez De La Barcena, Salto, F.E., 2003. Effect of highly active antiretroviral therapy on the incidence and clinical manifestations of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Infect. Dis.*, 37: 973-977.
- Ferreira, A., 2004. *Caracterização agrícola-florestal do concelho de Torres Novas*. Câmara Municipal de Torres Novas: 24 pp.
- Ferreira, F.C., 1945. A reacção das precipitinas aplicada aos dípteros do género *Phlebotomus*. *An. Inst. Med. Trop.*, 2: 187-196.

- Ferreira, F.C., Ferreira, T.G., 1944. Sobre a biologia das espécies de *Phlebotomus* de Lisboa e arredores. *An. Inst. Med. Trop*, 1: 289-313.
- Ferroglia, E., Maroli, M., Gastaldo, S., Mignone, W., Rossi, L., 2005. Canine leishmaniasis, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* (online) disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no10/04-0966.htm> (Visitado a 6 Junho, 2011).
- Filipe, A.R., 1974. Serological survey for antibodies to arboviruses in the human population of Portugal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68 (4): 311-5.
- França, C., 1913. *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) et fièvre à Pappataci au Portugal. *Bull. Soc. Pathol. Exotique*, 6: 123-124.
- França, C., 1918. Apontamentos para o estudo dos “*Phlebotomus*” portugueses. *A Medicina Moderna*, 295: 67-68.
- Frank, C., Hadziadoniou, M., Pratlong, F., Garifallou, A., Rioux, J.A., 1993. *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece. sixteen autochthonous cases. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 87: 184-185.
- Galati, E.A.B., 1995. Phylogenetic systematics of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) with emphasis on American groups. *Bol. Dir. Malariol. Saneam. Amb.* 35 (Supl.1): 133-142.
- Galati, E.A.B., 2003. Classificação de phlebotominae. In: E.F. Rangel e R. Lainson ed. *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro: 23-51.
- Gálvez, R., Descalzo, M.A., Miró, G., Jiménez, M.I., Martín, O., Dos Santos-Brandao, F., Guerrero, I., Cubero, E., Molina, R., 2010. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop.*, 115 (1-2): 95-102.
- Garifallou, A., Schnur, L.F., Stratigos, J.D., Hadziandoniou, M., Savigos, M., Stavrianeas, N., Cérié, C., 1984. Leishmaniasis in Greece II. Isolation and identification of the parasite causing cutaneous leishmaniasis in man. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 78:369-375.

- Geevarghese, G., Arankalle, V.A., Jadi, R., Kanojia, P.C., Joshi, M.V., Mishra, A.C., 2005. Detection of chandipura virus from sand flies in the genus *Sergentomyia* (Diptera: Phlebotomidae) at Karimnagar District, Andhra Pradesh. *Indian J. Med. Entomol.*, 42 (3): 495-496.
- Ghrab, J., Rhaim, A., Bach Hamba, D., Aoun, K., Bouratbine A., 2005. *Phlebotomus (Larroussius) langeroni* Nitzulescu, 1930, en Tunisie : présence de la femelle et actualisation de la distribution géographique. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 98 (5): 411-412.
- Ghrab, J., Rhaim, A., Bach Hamba, D., Chahed, M. K., Aoun, K., Nouria, S., Bouratbine, A., 2006. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of human leishmaniosis sites in Tunisia. *Parasite*, 13: 23-33.
- Gómez-Díaz, E., Figuerola, J., 2010. New perspectives in tracing vector-borne interaction networks. *Trends in Parasitology*, 26: 470-476.
- Gothe, R., Nolte, I., Kraft, W., 1997. Leishmaniasis of dogs in Germany: epidemiological case analysis and alternative to conventional causal therapy. *Tierärztliche Praxis*, 25: 68-73.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.*, 35: 1169–1180.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A., Pesson, B., Pichon, G., 2005. Entomological investigations in Chichaoua: an emerging epidemic focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *J. Med. Entomol.*, 42: 697-701.
- Guernaoui, S., Boumezzough, A., 2009. Habitat preferences of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in southwestern Morocco. *J. Med. Entomol.*, 46: 1187-1194.
- Haouas, N., Pesson, B., Boudabous, R., Dedet, J.P., Babba, H., Ravel, C, 2007. Development of a molecular tool for the identification of *Leishmania* reservoir hosts by blood meal analysis in the insect vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 77 (6): 1054–1059.
- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007. *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change - Summary for policymakers.*



(online) disponível em <http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg1/ar4-wg1-spm.pdf> (Visitado a 6 Junho, 2011).

- Ivočić, V., Chaniotis, V., Vujančić, M.B., Bobić, B., Nikolić, A., Klun, I., Zivković, T., Djurković-Djaković, O., 2010. Life tables and reproductive parameters of *Phlebotomus neglectus* Tonnoir, 1921 (Diptera, Psychodidae) under laboratory conditions. *Arch. Biol. Sci. Belgrade*, 62 (1): 153-157.
- Johnson, P.T., 1961. Autogeny in Panamanian *Phlebotomus* Sandflies (Diptera: Psychodidae). *Ann. Entomol. Soc. America*, 54 (1): 116-118.
- Jones, T.M, 2001. A potential cost of monandry in the lekking sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *J. Insect Behavior*, 15 (3): 385-399.
- Kaczmarek, S., 1993. Ectoparasites from nests of swallows *Delichon urbica* and *Hirundo rustica* collected in autumn. *Wiad. Parazytol.* 39 (4): 407-9.
- Kakarsulemankhel, J. K., 2009. Taxonomic review of sand flies of the subgenus *Phlebotomus* Rondani and Berte ( Diptera, Psychodidae). *Pakistan Entomologist*, 31 (2): 71-91.
- Kakarsulemankhel, J. K., 2010. Taxonomic review of sand flies of the subgenus *Paraphlebotomus* Theodor (Diptera, Psychodidae). *Pakistan Entomologist*, 32 (2): 125-147.
- Kassem, H.A., Hassan, A.N., 2003. Ovarian development and bloodfeeding activity in *Phlebotomus bergeroti* Parrot (Diptera: Psychodidae) from Egypt. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 97(5): 521-526.
- Killick-Kendrick, R., 1987. Breeding places of *Phlebotomus ariasi* in the Cevennes focus of leishmaniasis in the South of France. *Parassitologia*, 29: 181-191.
- Killick-Kendrick, R., 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.*, 17 (3): 279-289.
- Killick-Kendrick, R., 2002. The life-cycles of *Leishmania* in the sand-fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: *Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum*.

- Killick-Kendrick, R., 2010. Oriental sore, ancient tropical disease and hazard for European travelers. *Wellcome History*, 43: 4-6.
- Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M. 1999. Biology of sand fly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In *Canine Leishmaniasis: an Update*, Proc Intern Canine Leishmaniasis Forum, Barcelona: 26-31.
- Killick-Kendrick R., Rioux, J.A., Bailly, M., Guy, M.W., Wilkes, T.J., Guy, F.M., Davidson, I., Knechtli, R., Ward, R.D., Guilvard, E., Perieres, J., Dubois, H., 1984. Ecology of leishmaniasis in the South of France. 20 - Dispersal of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 as a factor in the spread of the visceral leishmaniasis in the Cévennes. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 59: 555-572.
- Killick -Kendrick, R., Wilkes, T.J., Alexander, J., Bray, R.S., Rioux, J.A., Bailly, M., 1985. The distance of attraction of CDC light traps to phlebotomine sandflies. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60: 763-767.
- Kishore, K., 2006. Vector control in leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123: 467-472.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6196-6200.
- Koehler, K., Stechele, M., Hetzel, U., Domingo, M., Schonian, G., Zahner, H., Burkhardt, E., 2002. Cutaneous leishmaniosis in a horse in southern Germany caused by *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, 109: 9-17.
- Kuhn, K. G., 1999. Global warming and leishmaniasis in Italy. *Bull. Trop. Med. Int. Health*, 7(2): 1-8.
- Kuhls, K., Chicharro, C., Cañavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J.P., Mauricio, I., Miles, M., Schaar, M., Ochsenreither, S., Radtke, O.A., Schöni, G., 2008. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2: e261. Doi:10.1371/journal.pntd.0000261.

- Kumar, V., Kesari, S.K., Sinha, N.K., Palit, A., Ranjan, A., Kishore, K., Saran, R., Kar, S.K., 1995. Field trial of an ecological approach for the control of *Phlebotomus argentipes* using mud and lime plaster. *Indian J. Med. Res.*, 101: 154-156.
- Kweku, A. M., Odoom, O., Puplampu, N., Desewu, K., Nuako, G.K., Gyan, B., Raczniak, G., Kronmann, K.C., Koram, K., Botero, S., Boakye, D., Akuffo, H., 2011. An outbreak of suspected cutaneous leishmaniasis in Ghana: lessons learnt and preparation for future outbreaks. *Glob. Health Action*, 4: 5527. Doi: 10.3402/gha.v4i0.5527.
- Lainson, R, Rangel, E.F., 2005. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100: 811-827.
- Lane, R.P., 1993. Sandflies (Phlebotominae). In: R.P. Lane & R.W. Crosskey, ed. *Medical Insects and Arachnids.*, Chapman & Hall, London: 78-119.
- Lane, R.P., Pile, M.M., Amerasinge, F.P., 1990. Anthropophagy and aggregation behaviour of the sand fly *Phlebotomus argentipes* in Sri Lanka. *Med.Vet. Entomol*, 4: 79-88.
- Lawyer, P. G., Perkins, P. V., 2000. Leishmaniasis and trypanosomiasis. In: *Medical Entomology*. Kluwer academic publishers: 231-298.
- Lawyer, P., Rowton, E., Westbrooke, K., 2011. *Recognition, Identification, Mounting and Dissection of phlebotomine sand flies, a basic training workshop*. 7<sup>th</sup> International Symposium on Phlebotomine Sand Flies, Kusadasi, Turkey, 25-30 April: 20 pp.
- Lawyer, P. G., Young, D. G., 1991. Diapause and quiescence in *Lutzomyia diabolica* (Diptera: Psychodidae). In: M. Maroli ed., First International Symposium on Phlebotomine Sandflies, Rome, Italy, *Parasitologia*, 33 (Supl.1): 353-360.
- Léger, N., Depaquit, J., 2001. Les phlebotomes et leur role dans la transmission des leishmanioses. *Rev. Fr. Lab.*, 338: 41-48.
- Léger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond G., Abbonec, E., 1983. Sur la différenciation des femelles du sous-genre *Larroussius* Nitzulescu, 1931 (Diptera, Phlebotomidae) de la région méditerranéenne. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 58 : 611-623.

- Lehane, M.J., 1997. Peritrophic Matrix Structure and Function. *Ann. Rev. Entomol.*, 43: 525-550.
- LeishRisk, 2011. *An introduction to neglected diseases and leishmaniasis* (online), disponível em <http://www.leishrisk.net> (Visitado a 18 Junho, 2011).
- Leng, Y.J., 1987. A preliminary survey of phlebotomine sandflies in limestone caves of Sichuan and Guizhou Provinces, southwest China, and description and discussion of a primitive new genus *Chinius*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 81: 311-317.
- Lewis, D.J., 1982. A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Entomol.*, 45: 121-209.
- Lewis, D.J., Domoney, C. R., 1966. Sugar meals in Phlebotominae and Simuliidae (Diptera). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series A, General Entomology*, 41: 175-179.
- Lewis, D.J., D. Macfarlane. 1981. The mites of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). In: E.U. Canning, ed. *Parasitological Topics, a Presentation Volume to P.C.C. Garnham F.R.S. on the occasion of his 80th birthday.* Soc. Protozol., Spec. Publ. No. 1: 177-183.
- Lewis, D.J., Young, D.G., Fairchild, G.B., Minter, D.M., 1977. Proposals for a stable classification of the Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *System Entomol.*, 2 (4): 319-332.
- Lubiarz, M., 2007. Dynamics of numbers and bionomy of *Lachnus roboris* (L.) on pedunculate oak (*Quercus robur* L.) in natural and degraded landscape. *Aphids and other hemipterous insects*, 13:129-135.
- Lucientes, J. Castillo, J.A., Gracia, M.J., Peribáñez, M.A., 2005. Flebotomos, de la biología al control. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, Vol. VI, 8: 1-8.
- Maia, C., Afonso, M.O., Neto, L., Dionísio, L., Campino, L., 2009. Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *J. Vector Borne Dis.*, 46: 268-272.
- Maia, C., Afonso, M.O., Freitas, F.B., Mendonça, J., Cristovão, J., Almeida, A.P., Campino, L., 2010b. Phlebotomine sand fly vectors of *Leishmania* in the Alqueva dam

region, Portugal. Escaide, European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology, Lisbon, Portugal, 11 a 13 Novembro. *Abstract book*: 170.

- Maia, C., Afonso, M.O., Cristóvão, J., Branco, S., Mendonça, J., Freitas, F.B., Almeida, A.P., Campino, L., 2011. Phlebotomine survey in the Algarve Region, Portugal 2009-2010. ISOPS 7, International Symposium on Phlebotomine Sandflies, Kusadisi, Turkey, 25-30 April. *Abstract book*: 190.

- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, A., Rebêlo, E., Campino, L., 2010a. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Vet. Parasitol.*, 3-4: 336-340.

- Maia, C., Nunes, M., Campino, L., 2008. Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector Borne Zoonot. Dis.*, 8 (4): 555-559.

- Maleki-Ravasan, N., Oshaghi, M.A., Javadian, E., Rassi, Y., Sadraei, J., Mohtarami, F., 2009. Blood meal identification in field-captured sand flies: comparison of PCR-RFLP and ELISA assays. *Iranian J. Arthropod-Borne Dis.*, 3 (1): 8-18.

- Malmqvist, B., Strasevicius, D., Hellgren, O., Adler, P.H., Bensch, S., 2004. Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 271: 152-155.

- Marcondes, C.B., 2007. A proposal of generic and subgeneric abbreviations of phlebotomines sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) of the world. *Entomol. News*, 118: 351-356.

- Maroli, M., Jalouk, L., Al-Ahmed, M., Bianchi, R., Bongiorno, G., Khoury, C., Gradoni, L., 2009. Aspects of the bionomics of *Phlebotomus sergenti* sandflies from an endemic area of anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria. *Med.Vet. Entomol.*, 23(2): 148-154.

- Maroli, M., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L., Gramiccia, M., 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.*, 145: 357-360.

- Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglio, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M. and Gradoni, L., 2008. The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine

- reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Internat. Health*, 13: 256-264. Doi: 10.1111/j.1365-3156.2007.01998.x.
- Mascari<sup>1</sup>, T.M., Clark, J., Gordon, S., Mitchell, M.A., Rowton, E.D., Stout, R., Foil, L.D., 2011. Oral treatment of rodents with insecticides for control of sand flies (Diptera: Psychodidae) and the fluorescent tracer technique (FTT) as a tool to evaluate potential sand fly control methods. *J. Vector Ecol.* 36 (Supl.1): 132-137.
  - Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Díaz V, Morillas-Márquez F., 2009. Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 15 (5): 795-798. Doi: 10.3201/eid1505.080969.
  - Martinez-Ortega, E., Conesa-Gallego, C.E., Macfarlane, D., 1983. Ectoparasitic mites on phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from Spain. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 77 (5): 545-546.
  - Meira, M., Ferreira, T., 1944. Espèces de Phlébotomes de Lisbonne et de ses environs. *An. Inst.Med.Trop*, 1: 269- 287.
  - Mendonça, J., 2011. *Risco de introdução de novas espécies de Leishmania na região do Algarve*. Tese de Mestrado, UNL, IHMT: 79 pp.
  - Morillas Márquez F, Benavides Delgado I, González Castro J, Reyes Magana A, Valero López A, 1985. Découverte de *Leishmania* sp. dans des *Rattus rattus* de la province de Granade (Espagne). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 60: 768-770.
  - Morillas Márquez F., Guevara Benitez D.C., Ubeda Ontiveros J.M., Gonzalez Castro J., 1983. Fluctuations annuelles des populations de phlebotomes (Diptera, Phlebotomidae) dans la province de Grenade (Espagne). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 58 (6): 625-632.
  - Morton, I., Ward, R.D., 1989. Laboratory responses of female *Lutzomyia longipalpis* sandflies to a host and male pheromone source over distance. *Med. Vet. Ent.*, 3: 219-223.
  - Mukabana, WR, Takken, W, Knols, BG., 2002. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends Parasitol.*, 18: 505-509.

- Müller, G.C., Schlein, Y., 2011. Different methods of using attractive sugar baits (ATSB) for the control of *Phlebotomus papatasi*. *J. Vector Ecol.* 36 (Supl.1): 64-70.
- Município de Torres Novas, 2009. *Mapa do Concelho de Torres Novas*. 1:50 000. Câmara Municipal de Torres Novas.
- Munstermann, L.E., 2004. Chapter 12: Phlebotomine sand flies, the Psychodidae. In: W.C. Marquardt, ed. *Biology of Disease Vectors*. Elsevier Academic Press, Burlington M.A., U.S.A.: 127-140.
- Mutinga, J., Kyai, F., Chege, K., Omogo, D. M., 1986. Epidemiology of leishmaniasis in Kenya-II. Host preference studies using various types of animal baits at animal burrows in Marigat, Baringo District. *Insect Sci. Applic.*, 7 (2): 191-197.
- Mutinga, M.J., Massamba, N.N., Basimike, M., Kamau, C.C., Amimo, F.A., Onyido, A.E., Omogo, D.M., Kyai, F.M., Wachira, D.W., 1994. Cutaneous leishmaniasis in Kenya: *Sergentomyia garnhami* (Diptera Psychodidae), a possible vector of *Leishmania major* in Kitui District: a new focus of the disease. *East Afr. Med. J.*, 71 (7): 424-428.
- Naucke, T.J., Menn, B., Massberg, D., Lorentz, S., 2008. Sandflies and leishmaniasis in Germany. *Parasitol Res.*, 103 (1): 65-68.
- Naucke, T.J., Schmitt, C., 2004. Is leishmaniasis becoming endemic in Germany? *Int. J. Med. Microbiol. Supplements*, 293 (37): 179-181.
- OMS – Organização Mundial de Saúde, 2003. Leishmaniasis: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. In: *Health and global environmental change series*, 2.WHO regional Office for Europe, Copenhagen: 1-32.
- OMS- Organização Mundial de Saúde, 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva. In: *WHO technical report series*, 949: 1- 201.
- OMS - Organização Mundial de Saúde, 2011. Leishmaniasis (online), disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (Visitado a 19 Junho, 2011).
- OnLeish, 2010. *OnLeish – Observatório Nacional das Leishmanioses*. Encontro de formação da Ordem dos Veterinários, Outubro de 2010, Monte da Caparica, Portugal.

- OnLeish - Observatório Nacional das Leishmanioses, 2011. A Leishmaniose Canina (online), disponível em <http://www.onleish.org/index.php?article=22&visual=3> (Visitado a 1 de Julho, 2011).
- Paiva, B.R., Secundino, N.F., Nascimento, J.C., Pimenta, P.F., Galati, E.A., Junior, H.F., Malafronte, R.S., 2006. Detection and identification of *Leishmania* species in field-captured phlebotomine sandflies based on mini-exon gene PCR. *Acta Trop.*, 99: 252-259.
- Papa, A., Velo, E., Bino, S., 2011. A novel phlebovirus in Albanian sandflies. *Clin. Microbiol Infect. In press.*
- ParaSite, 2011. *Leishmania* (online), disponível em <http://www.stanford.edu/class/humbio153/ImmuneEvasion/index.html> (Visitado a 19 Junho, 2011).
- Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T.A., 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, 11: 1633-1644.
- Pereira, M.A.M., 2008. Epidemiologia da leishmaniose canina. In: G. Santos-Gomes e I.P. Fonseca ed. *Leishmaniose canina*. Chaves Ferreira - Publicações S.A. Lisboa: 41-51.
- Pereira, M., Afonso, M.O., Machado, M., Sousa, M.C., 2009. Entomological survey of phlebotomine sand flies in a focus of visceral leishmaniasis in a regional centre of Portugal (Coimbra municipality). ESCMID, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finland, 16-19 May. *Abstract book*: S263.
- Pereira, M., Afonso, M.O., Nave, A., Sousa, M.C., 2010. Identificação de *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 no concelho de Coimbra, Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa. In press.*
- Pires, C.A., 1979. Contribuição ao conhecimento da distribuição e bioecologia dos flebótomos em Portugal (*Diptera, Psychodidae*). *Bolm. Soc. Port. Ciênc. Nat.* 19: 197-210.
- Pires, C.A., 1984. Les phlébotomes du Portugal I- Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911, par



*Leishmania* dans le foyer zoonotique de Arrábida (Portugal). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 59 (5): 521-524.

- Pires, C.A., 1985. Os flebótomos de Portugal (*Insecta, Diptera, Psychodidae*). II- Distribuição, variação anual e altitudinal dos flebótomos do foco zoonótico da Arrábida. *Actas do II Congresso Ibérico de Entomologia*, 1: 83-94.

- Pires, C.A., 1988. Os flebótomos de Portugal (*Diptera, Psychodidae*). III. - Exofilia e endofilia de *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus perniciosus* no foco de kala-azar de Arrábida. *Actas III Congresso Ibérico de Entomologia*: 821:828.

- Pires, C.A., 1979. Contribuição ao conhecimento da distribuição e bioecologia dos flebótomos em Portugal (*Diptera, Psychodidae*). *Bolm Soc. Port. Ciênc. Nat.*, 19: 197-210.

- Pires, C.A., 2000. *Os flebótomos (Diptera, Psychodidae) dos focos zoonóticos de leishmanioses em Portugal*. Tese de Doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa: 228 pp.

- Poche, D., Garlapati, R., Ingenloff, K., Poche, R., 2011. Control of adult and larval *Phlebotomus argentipes* by treating cattle with oral insecticides and insect growth regulators in India. ISOPS 7, International Symposium on Phlebotomine Sandflies, Kusadisi, Turkey, 25-30 April. *Abstract book*: 111-112.

- Pozio, E., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 1986. Hemoflagelles de *Tarentola mauritanica* L., 1758 (Reptilia, Gekkonidae). In: J.A. Rioux, ed. *Leishmania. Taxonomie et Phylogenese*. Montpellier, IMEEE: 149-155.

- Pozio E., Maroli M., Gradoni L., Gramiccia M., 1985. Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus rattus* by the bite of experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79: 524-526.

- Quinzel, R.J., Dye, C., Shaw, J.J., 1992. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med. Vet. Entomol.*, 6: 195-200.

- Ramaoui, K., Guernaoui, S., Boumezzough, A., 2008. Entomological and epidemiological study of a new focus of cutaneous leishmaniasis in Morocco. *Parasitol. Res.*, 103: 859-863. Doi: 10.1007/s00436-008-1068-3.

- Ramalho-Ortigao, M., Saraiva, E.M., Traub-Csekö, Y.M., 2010. Sand fly-*Leishmania* interactions: long relationships are not necessarily easy. *The Open Parasit. J.*, 4: 195-204.
- Ravel, C., Cortes, S., Pratlong, F., Morio, F., Dedet, J.P., Campino, L., 2006. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int. J. Parasitol.*, 36: 1383-1388.
- Ready, P.D., 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev. Sci. Tech.*, 27: 399-412.
- Ready, P.D., Croset, H., 1980. Diapause and laboratory breeding of *Phlebotomus perniciosus* Newstead and *Phlebotomus ariasi* Tonnoir (Diptera: Psychodidae) from southern France. *Bull. Entomol. Res.*, 70: 511-523.
- Rés, J.F., 1957. Contribuição para o conhecimento da leishmaniose em Portugal. *An. Inst. Med. Trop.*, 14: 527:545.
- Rioux, J.A., 2001. Trente ans de coopération franco-marocaine sur les Leishmanioses: dépistage et analyse des foyers. Facteurs de risque. Changements climatiques et dynamique noso-géographique. *Association des Anciens Élèves de L'Institut Pasteur*, 168: 90-101.
- Rioux, J.A., Aboulker, J.P., Lanotte, G., Killick-Kendrick, R., Martini-Dumas, A., 1985. Ecology of leishmaniasis in the south of France. 21. Influence of temperature on the development of *Leishmania infantum* Nicolle, 1908 in *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. Experimental study. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 60 (3): 221-229.
- Rioux, J. A., Albaret, J. L., Houin, R. Dedet, J. P., Lanotte, G., 1968. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les reservoirs selvatiques. Infestation spontanée de renard (*Vulpes vulpes* L.). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 43: 421-428.
- Rioux, J.A., Croset, H., Houin, R., Papierok, B., Tour, S., 1971. Observations sur les hauteurs de vol de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 46: 277-283.
- Rioux, J. A., Croset, H., N., Bailly- Choumara, H., 1974a. *Phlebotomus (Larroussius) mariae* n. sp. (Diptera, Psychodidae). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 49 : 91-101.

- Rioux J.A., de La Rocque S., 2003. Climat, leishmanioses et trypanosomes. In: F Rodhain, ed. *Changement climatique, maladies infectieuses et allergiques*. Annales de l'Institut Pasteur/Actualités, Elsevier, Paris: 41- 62.
- Rioux, J.A., Golvan, Y.J., Croset, H., Tour, S., Houin, R., Abonnenc, E., Petitdidier, M., Vollhardt, Y., Dedet, J.P., Albaret, J.L., Lanotte, G., Quilici, M., 1969. *Epidémiologie des Leishmanioses dans le Sud de la France*, Monographie 37, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris: 223 pp.
- Rioux J.A., Lanotte, G., Petter, F., Dereure, J., Akalay, O., Pratlong, F., Velez, I.D., Fikri, N.B., Maazoun, R., Denial, M., Jarry, D.M., Zahaf, A., Ashford, R.W., Cadi-Soussi, M., Killick-Kendrick, R., Ben Mansour, N., Moreno, G., Périères, J., Guilvard, E., Zribi, M., Kennou, M.F., Risipail, P., Knechtli, R., Serres, E., 1986. Les leishmanioses cutanées du bassin Méditerranéen occidental. De l'identification enzymatique à l'analyse éco-épidémiologique. L'exemple de trois "foyers", tunisien, marocain et français. In : J.A. Rioux, ed. *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Eco-épidémiologiques*. IMEEE, Montpellier : 365-395.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J., 1990. Taxonomy of *Leishmania*, use of isozymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 65: 111-125.
- Rioux, J.A., Risipail, P., Lanotte, G., Lepart, J., 1984. Relations phlébotomes-bioclimats en écologie des leishmanioses. Corollaires épidémiologiques. L'exemple du Maroc. *Bull. Soc. Bot. Franç.*, 131: 549-557.
- Risipail, P., Dereure, J., Jarry, D., 2002. Risk Zones of Human Leishmaniasis in the Western Mediterranean Basin. Correlations between Vector Sand Flies, Bioclimatology and Phytosociology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97(4): 477- 483.
- Risipail, P., Léger, N., 1998. Numerical taxonomy of Old World Phlebotomine (Diptera, Psychodidae). 2. Restatement of classification upon subgeneric morphological characters. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93: 787-793.
- Rivas-Martínez, S., 2001. *Bioclimatic Map of Europe - Thermotypes*. Cartographic Service, University of León. Spain.

- Rivas-Martínez, S., Loidi, J., Costa, M., Díaz, T., Penas, A., 1999. Iter Ibericum A.D. MIM. *Itinera Geobotanica*, 13: 5-347.
- Robert, L. L., Perich, M. J., Schlein, Y., Jacobson, J. L., Wirtz, R. A., Lawyer, P. G., Githure, J. I., 1997. Phlebotomine sand fly control using bait-fed adults to carry the larvicide's *Bacillus sphaericus* to the larval habitat. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 13: 140-144.
- Rocha, R., Jesus, J., 2009. “Osgas na Madeira?!” - *Proposta de projecto no contexto do ano internacional para a biodiversidade*. Seminário Regional Eco-Escolas, Seia, Portugal: 34 pp.
- Rogers, M.E., Chance, M.L., Bates, P.A., 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitol.* 124: 495-507.
- Rodgers, M.R., Popper, S.J., Wirth, D.F., 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol.*, 71 (3): 267-275.
- Rodrigues, P. D., Crespo, E.G., 1991. Aves. In: S.S Reis ed. *Enciclopédia Temática Portugal Moderno – Fauna*. POMO – Edições Portugal Moderno, Lda, Lisboa, Portugal: 109-159.
- Rolão, N., Martins, M.J., João, A., Campino, L., 2005. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12: 183-186.
- Rose, K., Curtis, J., Baldwin, T. Mathis, A. Kumar, B. Sakthianandeswaren, A. Spurck, T. Low Choy, J. Handman, E., 2004. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *Int. J. Parasitol*, 34: 655-664. Doi:10.1016/j.ijpara.2004.03.001.
- Rossi, E., Bongiorno, G., Ciolli, E., Di Muccio, T., Scalone, A., Gramiccia, M., Gradoni, L., Maroli, M., 2008. Seasonal phenology, host-blood feeding preferences and natural *Leishmania* infection of *Phlebotomus perniciosus* (Diptera, Psychodidae) in a high-endemic focus of canine leishmaniasis in Rome province, Italy. *Acta Trop.* 105(2): 158-65.

- Sabin, A.B., Philip, C.B., Paul, J.R., 1944. *Phlebotomus* (pappataci or sandfly) fever. A disease of military importance, summary of existing knowledge and preliminary report of original investigations. *J.A.M.A.*, 125: 603-606.
- Sacks, D.L., 2001. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Cell. Microbiol.*, 3: 189-196.
- Sacks, D.L., Kamhawi, S., 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Ann. Rev. Microbiol.*, 55: 453-483.
- Saraiva, L., Andrade-Filho, J.D., Silva, S.O., Andrade, A.S.R., Melo, M.N., 2010. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105 (8): 1033-1039.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L., Messer, G., 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89: 9944-9948.
- Schlein, Y., Yuval, B., Jacobson, R. L., 1989. Leishmaniasis in the Jordan Valley: differential attraction of dispersing and breeding site populations of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to manure and water. *J. Med. Entomol.*, 26: 411-413.
- Schönián, G., Nasereddin, A., Dinse, N., Schweynoch, C., Schallig, H., Presber, W., Jaffe, C.L., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 47: 349-358.
- Schrey, C., Pires, C., Macvean, D., 1989. Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal. *Med. Vet. Entomol.*, 3: 125-30.
- Seccombe, A.K., Ready, P.D., Huddleston, L.M., 1993. A catalogue of Old World phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae). *Occas. Pap. Syst. Entomol.*, 8: 1-57.
- Senghor, M.W., Faye, M.N., Faye, B., Diarra, K., Elguero, E., Gaye, O., Bañuls, A-L, Niang, A.A., 2011. Ecology of Phlebotomine Sand Flies in the Rural Community of

- Mont Rolland (Thiès Region, Senegal): Area of Transmission of Canine Leishmaniasis. *PLoS One*, 6 (3): e14773. Doi: 10.1371/journal.pone.0014773.
- Semião-Santos, S.J., Harith, A.E., Ferreira, E., Pires, C.A., Sousa, C.A., Gusmão, R., 1995. Évora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. *Parasitol. Research*, 81: 235-239.
  - Simões, J., 2003. Caracterização Física do Concelho de Torres Novas, In: *Volume 1 dos Estudos de Caracterização da 1ª Fase de Análise da Revisão do PDM de Torres Novas*. Câmara Municipal de Torres Novas: 107 pp.
  - Singh, K.V., 1999. Studies on the role of climatological factors in the distribution of Phlebotomine sandflies (Diptera, Psychodidae) in semi-arid areas of Rajasthan, India. *J. Arid Environments*, 42: 43-48.
  - Snow, D., Perrins, C. M., 1998. *The Birds of the Western Palearctic, Concise Edition*. Oxford: Oxford University Press, Volume 2: 1066-1069.
  - Stierhof, Y.-D., Bates, P.A., Jacobson, R.L., Rogers, M.E., Schlein, Y., Handman, E., Ilg, T., 1999. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstructs the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur. J. Cell. Biol.*, 7: 675-689.
  - Svobodová, M., Alten, B., Zídková, L., Dvořák, V., Hlavačková, J., Myšková, J., Šeblová, V., Kasap, O.E., Belen, A., Votýpka, J., Volf, P. 2009. Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* transmitted by *Phlebotomus tobbi*. *Int. J. Parasitol.*, 39: 251-256.
  - Svobodová, M., Sadlova, J, Chang, KP, Volf, P., 2003. Short report: distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68: 6-9.
  - Swift, S.F., 1987. A new species of *Stigmaeus* (Acari: Prostigmata: Stigmaeidae) parasitic on phlebotomine flies (Diptera: Psychodidae). *Internal J. Acarol.*, 13 (4): 239-243.

- Tabbabi, A., Ghrab, J., Aoun, K., Ready, P.D., Bouratbine, A., 2011. Habitats of the sandfly vectors of *Leishmania tropica* and *L. major* in a mixed focus of cutaneous leishmaniasis in southeast Tunisia. *Acta Trop.*, 119 (2-3): 131-137.
- Theodor, O., 1948. Classification of the Old World species of the subfamily Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Bull. Entomol. Res.*, 39: 85-115.
- Theodor, O., 1958. Psychodidea-Phlebotominae. In: *Die Fliegen der palaearktischen Region*, 9c: 1-55.
- Virbac, 2011. Canine leishmaniosis: the CaniLeish® vaccine obtains a European registration. Virbac S.A. (online), disponível em [www.virbac.com](http://www.virbac.com) (Visitado a 8 Junho, 2011).
- Volf, P., Benkova, I., Myskova, J., Sadlova, J., Campino, L., Ravel, C., 2007. Increased transmission potential of *Leishmania major*/*Leishmania infantum* hybrids. *Int. J. Parasitol.*, 37: 589-593.
- Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J., Votypka, J., 2004. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *Int. J. Parasitol.*, 34: 1221-1227.
- Warburg, A., Faiman, R., 2011. Research priorities for the control of phlebotomine sand flies. *J. Vector Ecol.*, 36 (Supl.1): 10-16.
- Ward, R.D., Morton, I.E., 1991. Pheromones in mate choice and sexual isolation between siblings of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae). *Parassitologia*, 33 (Supl.1): 527-533.
- Ward, R.D., Phillips, A., Burnet, B., Marcondes, C.B., 1988. The *Lutzomyia longipalpis* complex: reproduction and distribution. In: M.W. Service, ed. *Biosystematics of Haematophagous Insects*. Systematics Association Special Volume. Clarendon Press, Oxford, 37: 257-269.
- Wasserberg, G., Poche, R., Miller, D., Chenault, M., Zollner, G., Rowton, E.D., 2011. Imidacloprid as a potential agent for the systemic control of sand flies. *J. Vector Ecol.*, 36 (Supl.1): 148-156.

- WRBU -Walter Reed Biosystematics Unit, 2011. *Medically important sand flies*. (online) Disponível em [http://wrbu.si.edu/eucom\\_SF.html](http://wrbu.si.edu/eucom_SF.html) (Visitado a 18 Março de 2011).
- Zhioua, E., Moureau G., Chelbi, I., Ninove, L., Bichaud, L., Derbali, M., Champs, M., Cherni, S., , Salez, N., Cook, S., Lamballerie, X., and Charrel, R., 2010. Punique virus, a novel phlebovirus, related to sandfly fever Naples virus, isolated from sandflies collected in Tunisia. *J. Gen. Virol.*, 91: 1275-1283.



## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

<b>Figura 1</b> - Flebótomos adultos, fêmea e macho, conservados em álcool. ....	1
<b>Figura 2</b> - Vista dorsal da cabeça de um flebótomo e pormenor da faringe e cibário ....	3
<b>Figura 3</b> - Asa de flebótomo e respectiva nomenclatura das nervuras e parâmetros alares .....	4
<b>Figura 4</b> - Pormenor da extremidade posterior do abdómen de um flebótomo macho e respectivas estruturas genitais externas e internas .....	5
<b>Figura 5</b> - Pormenor da extremidade posterior do abdómen de um flebótomo fêmea e respectivas estruturas genitais internas .....	6
<b>Figura 6</b> - Ciclo de vida dos flebótomos: fase aérea e terrestre .....	10
<b>Figura 7</b> - Distribuição mundial das leishmanioses humanas: cutânea, mucocutânea e visceral .....	17
<b>Figura 8</b> - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. ....	21
<b>Figura 9</b> - Ilustração do aparelho digestivo de um flebótomo fêmea e desenvolvimento intravectorial de <i>Leishmania</i> sp. ....	23
<b>Figura 10</b> - Distribuição Europeia e Mediterrânica das várias espécies, do Género <i>Phlebotomus</i> , assinaladas em Portugal .....	28
<b>Figura 11</b> - Pontos de amostragem para flebótomos em Portugal Continental e respectiva presença/ausência das espécies comprovadamente vectoras de <i>L. infantum</i> .....	31
<b>Figura 12</b> - Mapa de Portugal com a localização da área de estudo: Concelho de Torres Novas .....	46
<b>Figura 13</b> - Termotipos na Península Ibérica .....	50
<b>Figura 14</b> - Armadilha luminosa miniaturizada do tipo CDC modificada e respectiva gaiola .....	53
<b>Figura 15</b> - Exemplos de biótopos domésticos .....	55
<b>Figura 16</b> - Exemplos de biótopos peridomésticos. ....	56
<b>Figura 17</b> - Exemplos de biótopos silváticos .....	57
<b>Figura 18</b> - Fêmeas de flebótomo: A - alimentada, B - grávida .....	60
<b>Figura 19</b> - Genitália de <i>S. minuta</i> macho .....	63
<b>Figura 20</b> - Genitália de <i>P. sergenti</i> macho .....	64
<b>Figura 21</b> - Genitália de <i>P. papatasi</i> macho .....	65
<b>Figura 22</b> - Genitália de <i>P. ariasi</i> macho .....	66
<b>Figura 23</b> - Genitália de <i>P. perniciosus</i> macho .....	67

<b>Figura 24</b> - Espermateca de <i>S. minuta</i> .....	68
<b>Figura 25</b> - Espermateca de <i>P. ariasi</i> .....	69
<b>Figura 26</b> - Espermateca de <i>P. perniciosus</i> .....	70
<b>Figura 27</b> - Espermateca de <i>P. papatasi</i> .....	71
<b>Figura 28</b> - Espermateca de <i>P. sergenti</i> .....	72
<b>Figura 29</b> - Material utilizado para a extracção de DNA a partir de flebótomos .....	74
<b>Figura 30</b> - Abundância relativa das várias espécies flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas .....	84
<b>Figura 31</b> - Variação mensal da razão dos sexos para as espécies flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas .....	85
<b>Figura 32</b> - Proporção de fêmeas alimentadas e grávidas das várias espécies flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas e sua variação mensal .....	86
<b>Figura 33</b> - <i>P. perniciosus</i> macho, parasitado por dois ácaros .....	87
<b>Figura 34</b> - Pormenor de <i>P. perniciosus</i> fêmea parasitada por um nemátode .....	88
<b>Figura 35</b> - Densidades flebotomínicas totais, temperatura média e humidade relativa média no Concelho de Torres Novas .....	89
<b>Figura 36</b> - Variação mensal da densidade de <i>P. perniciosus</i> , temperatura média e humidade relativa média no Concelho de Torres Novas .....	90
<b>Figura 37</b> - Variação mensal da densidade de <i>P. ariasi</i> , temperatura média e humidade relativa média no Concelho de Torres Novas .....	91
<b>Figura 38</b> - Variação mensal da densidade de <i>P. sergenti</i> , temperatura média e humidade relativa média no Concelho de Torres Novas .....	92
<b>Figura 39</b> - Variação mensal da densidade de <i>S. minuta</i> , temperatura média e humidade relativa média no Concelho de Torres Novas .....	93
<b>Figura 40</b> - Variação mensal da temperatura (média, mínima e máxima, em °C) e humidade relativa (média e máxima, em %) no Concelho de Torres Novas, no período de Junho a Novembro de 2010 .....	94
<b>Figura 41</b> - Freguesias e localidades prospectadas para a presença de flebótomos no Concelho de Torres Novas .....	95
<b>Figura 42</b> - Espécies flebotomínicas capturadas, por localidade, no Concelho de Torres Novas .....	96
<b>Figura 43</b> - Densidade de <i>P. perniciosus</i> por freguesia no Concelho de Torres Novas .....	99
<b>Figura 44</b> - Densidade de <i>P. ariasi</i> por freguesia no Concelho de Torres Novas .....	100

<b>Figura 45</b> - Densidades flebotomínicas por tipo principal de biótopo no Concelho de Torres Novas .....	102
<b>Figura 46</b> - Densidades de <i>P. perniciosus</i> e <i>P. ariasi</i> em diferentes tipos de biótopo que incluem canis .....	105
<b>Figura 47</b> - Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR com as sequências iniciadoras MC1/ MC2.....	121
<b>Figura 48</b> - Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR com as sequências iniciadoras LITSR / L5.8S e restrição enzimática com a endonuclease HaeIII .....	121
<b>Figura 49</b> - Biótopo onde foi capturada a fêmea de <i>P. ariasi</i> infectada por <i>L. infantum</i> .....	123
<b>Figura 50</b> - Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR com as sequências iniciadoras CytB1-F/CytB2-R, de um segmento do gene “Cit b” de vertebrados .....	124
<b>Figura 51</b> - Proporção das diferentes fontes sanguíneas das fêmeas flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas .....	125
<b>Quadro 1</b> - Géneros da Subfamília Phlebotominae e sua distribuição geográfica .....	8
<b>Quadro 2</b> - Duração aproximada das várias fases do ciclo de vida dos flebótomos ....	10
<b>Quadro 3</b> - Espécies de <i>Leishmania</i> patogénicas para humanos .....	16
<b>Quadro 4</b> - Abundância relativa das várias espécies flebotomínicas capturadas em Portugal .....	29
<b>Quadro 5</b> - Freguesias do Concelho de Torres Novas, respectiva área e densidade populacional .....	47
<b>Quadro 6</b> - Espécies flebotomínicas do Género <i>Phlebotomus</i> actualmente assinaladas em Portugal, Espanha e Marrocos e sua restante distribuição geográfica. Distribuição de <i>S. minuta</i> .....	61
<b>Quadro 7</b> - Sequências dos “primers” MC (MC1 e MC2).....	77
<b>Quadro 8</b> - Condições de amplificação do kDNA com os “primers” MC (MC1 e MC2) .....	78
<b>Quadro 9</b> - Sequências dos “primers” ITS1 (LITSR e L5.8S).....	78
<b>Quadro 10</b> - Condições de amplificação do rDNA com os “primers” ITS1 (LITSR e L5.8S) .....	79
<b>Quadro 11</b> - Sequências dos “primers” CytB1- F e CytB2-R, para amplificação de um segmento do gene citocromo b de vertebrados .....	80

<b>Quadro 12</b> - Condições de amplificação de um fragmento do gene citocromo b de vertebrados com os “ <i>primers</i> ” cytB1- F e cytB2-R .....	81
<b>Quadro 13</b> - Número de flebótomos capturados no Concelho de Torres Novas, Portugal e sua abundância relativa .....	83
<b>Quadro 14</b> - Número de fêmeas alimentadas e grávidas, das várias espécies flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas .....	85
<b>Quadro 15</b> - Densidades flebotomínicas por espécie e por mês no Concelho de Torres Novas .....	88
<b>Quadro 16</b> - Lista das localidades prospectadas no Concelho de Torres Novas, latitudes, longitudes, altitudes médias dos biótopos e espécies flebotomínicas encontradas .....	97
<b>Quadro 17</b> - Freguesias, coordenadas dos biótopos prospectados, espécies flebotomínicas detectadas no Concelho de Torres Novas e respectivas densidades .....	98
<b>Quadro 18</b> - Densidades flebotomínicas por tipo principal de biótopo no Concelho de Torres Novas .....	101
<b>Quadro 19</b> - Densidades flebotomínicas em biótopos domésticos, por espécie e por tipo de biótopo, capturados no Concelho de Torres Novas .....	102
<b>Quadro 20</b> - Densidades flebotomínicas em biótopos peridomésticos, por espécie e por tipo de biótopo, capturados no Concelho de Torres Novas .....	103
<b>Quadro 21</b> - Densidades flebotomínicas em biótopos silváticos, por espécie e por tipo de biótopo, capturados no Concelho de Torres Novas .....	105
<b>Quadro 22</b> - Resultados da regressão logística simples para a presença de <i>P. perniciosus</i> no Concelho de Torres Novas .....	106
<b>Quadro 23</b> - Resultados da regressão logística múltipla para a presença de <i>P. perniciosus</i> no Concelho de Torres Novas .....	108
<b>Quadro 24</b> - Resultados da regressão logística simples para a presença de <i>P. ariasi</i> no Concelho de Torres Novas .....	109
<b>Quadro 25</b> - Resultados da regressão logística múltipla para a presença de <i>P. ariasi</i> no Concelho de Torres Novas .....	111
<b>Quadro 26</b> - Resultados da regressão logística simples para a presença de <i>P. sergenti</i> no Concelho de Torres Novas .....	112
<b>Quadro 27</b> - Resultados da regressão logística múltipla para a presença de <i>P. sergenti</i> no Concelho de Torres Novas .....	114
<b>Quadro 28</b> - Resultados da regressão logística simples para a presença de <i>S. minuta</i> no Concelho de Torres Novas .....	115

<b>Quadro 29</b> - Resultados da regressão logística múltipla para a presença de <i>S. minuta</i> no Concelho de Torres Novas .....	117
<b>Quadro 30</b> - Número de biótopos positivos para cada uma das espécies flebotomínicas assinaladas no Concelho de Torres Novas e respectivo resultado do teste de associação de Spearman .....	119
<b>Quadro 31</b> - Taxa de infecção por <i>L. infantum</i> das fêmeas flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas .....	122
<b>Quadro 32</b> - Identificação da fonte das refeições sanguíneas das fêmeas flebotomínicas capturadas no Concelho de Torres Novas, por análise da sequência obtida após amplificação de um segmento do gene “Cit b” .....	125
<b>Quadro 33</b> - Espécies flebotomínicas, tipo e espécies de vertebrado em que se alimentaram, tipo de biótopo e animais domésticos presentes num raio de 30 m da armadilha CDC .....	126

## ANEXOS

## Anexo 1 – Folheto Informativo do Estudo a realizar

## Estudo de insectos transmissores de leishmaniose canina em Torres Novas



### O que é a leishmaniose canina?

Trata-se de uma **doença parasitária** grave do cão, causada por um protozoário (parasita microscópico), denominado *Leishmania*, transmitido por um **flebótomo** - insecto relativamente



parecido com um mosquito, mas mais pequeno. A **Leishmaniose** pode transmitir-se ao Homem. Em Portugal, a transmissão ao Homem é rara e considerada accidental.



É transmitida pela picada do insecto e **NÃO** por cães infectados.

Estamos a realizar um estudo para identificar as espécies deste insecto presentes na região de **Torres Novas**, as recolhas são realizadas colocando pequenas gaiolas de captura perto de residências ou abrigos de animais (do pôr ao nascer do Sol), pelo que estamos a solicitar a residentes locais autorização para a sua colocação.

### A SUA AJUDA É IMPORTANTE!

Nome	Contacto

Por favor indique o seu nome e contacto caso pretenda participar

Sofia Branco, X Mestrado em Parasitologia Médica, IHMT

Anexo 2 – Ficha de Campo**FLEBÓTOMOS - Ficha de Campo**

Biótopo nº.....

**1- LOCALIZAÇÃO**

Distrito de Santarém; Concelho de Torres Novas; Aldeia.....

Latitude.....

Longitude.....

Altitude.....

**2-TIPO DE FORMAÇÃO SUPERFICIAL**☐ a- solo calcário☐ d- solo terroso☐ b- solo arenoso☐ e- outro.....☐ c- solo argiloso**3- CARACTERÍSTICAS FITOGEográfICAS**

Tipo de vegetação predominante

☐ a - videira☐ f - eucalipto☐ b - oliveira☐ g - fruteiras☐ c - carvalho☐ h - horta familiar☐ d - figueira☐ i - cultura cerealífera☐ e - pinheiro☐ j - outro.....**4- LOCAL DE CAPTURA**☐ a - casa - interior/exterior.....☐ b - abrigo animal ..... interior/exterior.....☐ c - abrigo artificial☐ d - buraco nas rochas☐ e - parede☐ f - gruta☐ g - outro.....**5- ANIMAIS EXISTENTES/QUANTIDADE**☐ a - cão/ nº ....☐ c - gado bovino☐ b - gato/nº ....☐ d - gado ovino☐ c - aves capoeira/nº ....☐ e - outros animais domésticos/nº.....☐ d - coelhos/nº ....☐ f - animais silváticos: quais.....nº....**6- PRESENÇA/AUSÊNCIA DE COLEIRAS INSECTICIDAS EM CÃES**☐ a - sem coleira☐ a - com coleira/ Marca.....**7- HUMIDADE APARENTE**☐ a - seco☐ c - húmido☐ b - semi-húmido☐ d - muito húmido

Sofia Branco, X Mestrado em Parasitologia Médica, IHMT (adaptado de Pires, 2000)

8-TEMPERATURA .....°C

9-PRESENÇA DE VENTO/CHUVA

☐ a- vento

☐ d- sem vento ou chuva

☐ b- chuva

☐ c- vento e chuva

10-TIPOS DE CAPTURA

☐ a- armadilha CDC (nº.....)

☐ b- aspirador eléctrico (.....m)

☐ c- outro.....

11-CAPTURA

A- data....., Hora.....

B - duração da captura (horas).....

C- nº de (capturadores/CDC).....

12-ESPÉCIES ENCONTRADAS (IDENTIFICAÇÃO EM LABORATÓRIO)

Espécies	MM	FF	ALM	GRV	TOTAL
<i>P. papatasi</i>					
<i>P. sergenti</i>					
<i>P. ariasi</i>					
<i>P. perniciosus</i>					
<i>S. minuta</i>					
Total					

13-ICONOGRAFIA - Foto nº..... data ..... Hora.....

14- COLECTOR.....

15-DESCRIÇÃO/OBSERVAÇÕES

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



Anexo 3 - Lista do material utilizado na identificação dos imagos

- Esteromicroscópio (Wild Heerbrugg, M-8) associado a um sistema de iluminação exterior com fibra óptica, fonte de luz fria (Olympus, Highlight 2100).
- Microscópio óptico, (Leitz, Dialux 22) com sistema de iluminação acoplado (Ernst Leitz, Wetzlar GMBH).
- Estufa (Stockolm, Elektra Helios).
- Agulhas de dissecação.
- Lâminas de vidro e microlamelas.
- Placas de Petri e godés de vidro.
- Lamparina com álcool.
- Pinças entomológicas em Inox.
- Pipetas de plástico com a extremidade cortada.
- Seringas descartáveis de 1ml com agulhas de ponta fina.
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml.
- Varetas de vidro.
- Fita adesiva Tesa 4316, 50 m.
- Canetas (marcadores de ponta fina de uma só côr).
- Canetas (marcadores de ponta grossa de duas cores diferentes).
- Papel de filtro.
- Soluta de Marc-André (soluta esclarecedor): água destilada 30ml, hidrato de cloral 30g e ácido acético cristalizado 30g (Abbonenc, 1972).
- Meio de Hoyer (meio de montagem).
- Álcool 90%.

# Anexo 4 – Dados Meteorológicos fornecidos pelo Instituto de Meteorologia, I.P., Portugal



## Tomar / Vale Donas

### Valores médios mensais

Período : Junho a Novembro de 2010

2010	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
Tmin	14.0	16.4	16.3	13.7	9.0	4.7
ND	30	31	31	30	31	15
Tmáx	28.5	34.0	35.0	29.7	22.3	16.7
ND	30	31	31	30	31	15
Tmed	21.2	25.2	25.6	21.7	15.7	10.7
ND	30	31	31	30	31	15
Hmed	76	65	60	72	83	86
ND	30	31	31	30	31	15
Hmáx	98	93	92	96	99	100
ND	30	31	31	30	31	15

Tmin » Temperatura mínima do ar (°C)

Tmáx » Temperatura máxima do ar (°C)

Tmed » Temperatura média do ar (°C)

Hmed » Humidade relativa média do ar (%)

Hmáx » Humidade relativa máxima do ar (%)

ND » Nº de dias com dados observados para cada mês

Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior  
Instituto de Meteorologia, I. P.

Rua C – Aeroporto de Lisboa  
1749-077 Lisboa – Portugal

Tel.: (351) 21 844 7000  
Fax: (351) 21 840 2376



e-mail: [informacoes@meteo.pt](mailto:informacoes@meteo.pt)  
URL: <http://www.meteo.pt>

1/1